
Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
des Zentrums für Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Drewelow

Untersuchungen zur Pharmako- und Toxikodynamik von ausgewählten
Arzneistoffen am Modell des humanen Phagozyten und zum Einsatz der
Festphasenmikroextraktion als Probenvorbereitungsverfahren
für die quantitative Arzneistoffbestimmung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften
(Doctor rerum humanarum)

der Universitätsmedizin
der Universität Rostock

vorgelegt von Ricarda Kegler
geb. am 02.12.1981 in Neuruppin

Rostock, Juni 2015

GUTACHTER DER DISSERTATION:

Prof. Dr. Bernd Drewelow, Universitätsmedizin der Universität Rostock

Prof. Dr. Udo Kragl, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Rostock

Dr. Detlef Thieme, Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie Dresden

Die Arbeit wurde am 05.08.2014 zur Begutachtung an der Universität Rostock eingereicht.

Die öffentliche Verteidigung fand am 03.06.2015 an der Universität Rostock statt.

„Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow.

The important thing is to not stop questioning.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	V
GLEICHUNGSVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Festphasenmikroextraktion (Solid-Phase Microextraction, SPME)	8
1.2 Untersuchte antimikrobielle Arzneistoffe	11
1.2.1 Daptomycin (DPT)	11
1.2.2 Levofloxacin (LVX)	13
1.2.3 Clindamycin (CLI)	13
1.2.4 Linezolid (LNZ)	14
1.2.5 Sirolimus (SRL)	14
2 FRAGESTELLUNG	16
3 MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 Substanzen	17
3.2 Geräte	18
3.3 Untersuchungen zum Einfluss ausgewählter Antibiotika auf spezifische PMN-Funktionen	19
3.3.1 Isolierung von PMN aus humanem Vollblut	19
3.3.2 Eingesetzte Antibiotika-Konzentrationen in den Zellstudien	20
3.3.3 Bestimmung der zellassozierten Arzneistoffkonzentrationen	20
3.3.4 Berechnung der zellassozierten Arzneistoffkonzentration	21
3.3.5 Zellviabilität	21
3.3.6 Chemotaxis	22
3.3.7 Phagozytose und „Oxidative Burst“	23
3.3.8 Sekretion von Zytokinen	24
3.4 SPME von Arzneistoffen	24
3.4.1 Herstellung von Polymer-beschichteten SPME-Sonden	24
3.4.2 Präkonditionierung der SPME-Sonden	25
3.4.3 SPME von Antibiotika aus verschiedenen Adsorptionslösungen	25
3.4.3.1 Einfluss der Sondenbeschaffenheit, pH-Werte, Salzkonzentrationen und Blutantikoagulation auf die SPME-Ausbeuten	26
3.4.3.2 Einfluss von Extraktionszeiten und –temperaturen auf die SPME-Ausbeuten	27
3.4.3.3 Einfluss von Agitation der Adsorptionslösungen auf die SPME-Ausbeuten	27
3.4.4 SPME unter Verwendung des Herz-Lungen-Maschinen Modells (HLM)	28
3.4.5 SPME von SRL aus einer Patientenprobe	29
3.5 Berechnung der mittels SPME bestimmten PPB	29
3.6 Bestimmung der PPB mittels Ultrafiltration (UF)	30
3.7 Aufarbeitung von arzneistoffhaltigen Proben	30
3.8 Quantitative Bestimmung der Arzneistoffkonzentrationen	31

3.8.1	Entwicklung und Validierung von zwei HPLC-Methoden zur quantitativen Bestimmung von DPT mittels UV- oder massenspektrometrischer Detektion	31
3.8.1.1	Chromatographische Bedingungen	31
3.8.1.2	Probenvorbereitung	32
3.8.1.3	Kalibrierung und Validierung der HPLC-Methoden	33
3.8.1.4	Messung von DPT-haltigen Blutproben von Patienten	34
3.8.2	Flüssigchromatographische Analyse von DPT, LVX, CLI, LNZ und SRL	34
3.9	Statistische Auswertungen	36
4	ERGEBNISSE	37
4.1	Methodenentwicklung und –validierung zur quantitativen Bestimmung von DPT	37
4.2	Einfluss ausgewählter Arzneistoffe auf spezifische PMN-Funktionen	40
4.3	Untersuchungen zur SPME von freien Arzneistoffkonzentrationen	45
4.3.1	Evaluation von optimierten SPME-Versuchsbedingungen	45
4.3.1.1	Beschaffenheit der Faserbeschichtungen	46
4.3.1.2	Polymerbeschichtungen der Fasern, Extraktionszeiten und –temperaturen	47
4.3.1.3	Blutantikoagulantien, Salzkonzentration und pH-Wert	52
4.3.1.4	Agitation der Adsorptionslösung	53
4.3.2	SPME unter Verwendung des HLM-Modells	54
4.4	SPME von SRL aus einer Patientenprobe	57
4.5	Konventionelle Arzneistoffanalysen	57
4.6	Bestimmung der PPB mittels SPME	58
4.7	Bestimmung der PPB mittels UF	62
5	DISKUSSION	65
5.1	Methodenentwicklung und –validierung zur quantitativen Bestimmung von DPT	65
5.2	Einfluss ausgewählter Arzneistoffe auf spezifische Zellfunktionen von PMN	66
5.3	Festphasenmikroextraktion (SPME) von Arzneistoffen	77
6	ZUSAMMENFASSUNG	92
7	LITERATURVERZEICHNIS	93
8	ANHANG	115
8.1	Selbständigkeitserklärung	115
8.2	Danksagung	116
8.3	Publikationsliste	117
8.3.1	Originalarbeiten	117
8.3.2	Abstracts	117
8.4	Tagungsbeiträge	118
8.5	Vorträge	120
8.6	Preise	120
8.7	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Vereinfachte Darstellung der zellspezifischen Funktionen Aktivierung, Chemotaxis, Phagozytose und „Oxidative Burst“ von humanen PMN infolge einer bakteriellen Infektion.	2
Abb. 2:	Vereinfachte Darstellung des „Arbeitsprinzipes“ der SPME.	9
Abb. 3:	Repräsentative LC-Chromatogramme einer undotierten (Blank) und zweier mit DPT dotierten Zitratplasma-proben unter Verwendung einer Nucleosil® C8 HD-Säule: (A) UV-Detektion von 1,0 mg/L und 10,0 mg/L DPT ($t_R = 11,2$ min) mit 4,0 mg/L Ethylparaben ($t_R = 4,9$ min) bei 219 nm, (B) MS-Detektion von 0,1 mg/L und 1,0 mg/L DPT, Massenspur $m/z = 809,0$ ($z=2$).	37
Abb. 4:	Repräsentative LC-Chromatogramme einer undotierten (Blank) und einer mit DPT dotierten Zitratplasma-probe unter Verwendung einer Luna® C8-Säule: UV-Detektion von 1,0 mg/L DPT ($t_R = 4,9$ min) mit 4,0 mg/L Ethylparaben ($t_R = 4,3$ min) bei 219 nm, <i>Einschub</i> : MS-Detektion von 0,1 mg/L und 1,0 mg/L DPT, Massenspur $m/z = 809,0$ ($z=2$).	38
Abb. 5:	Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von DPT aus humanem Zitratplasma unter Verwendung einer Luna® C8-Säule mittels UV-Detektion ($C = 0,5 - 15,0$ mg/L) und MS-Detektion ($C = 0,02 - 1,50$ mg/L; <i>Einschub</i>).	39
Abb. 6:	Veränderungen der PMN-Viabilität im Verlauf einer Inkubation mit C_{max} von LVX (5,0 mg/L), DPT (60,0 mg/L) oder CLI (3,50 mg/L) sowie Veränderungen der Gesamtzellzahl an PMN (8 – 17 h).	41
Abb. 7:	Zellassozierte Akkumulation von LVX und DPT in PMN für drei verschiedene extrazelluläre Konzentrationen.	41
Abb. 8:	Einfluss von $2x C_{max}$ an LVX (10,0 mg/L), DPT (120,0 mg/L) und CLI (7,00 mg/L) auf das Wanderungsverhalten (Migrationsindex, MI) von PMN in Richtung einer ZAS-haltigen Quelle.	42
Abb. 9:	Einfluss von drei verschiedenen Konzentrationen an LVX, DPT und CLI auf die Phagozytoseaktivität (Phagozytoseindex, PI) humaner PMN gegenüber FITC- <i>E.coli</i> .	43
Abb. 10:	Einfluss von drei verschiedenen Konzentrationen an LVX, DPT und CLI auf die Freisetzung anionischer und radikalischer Sauerstoffspezies („Oxidative Burst“-Index, BI) durch humane PMN, nachdem diese mit PMA stimuliert wurden.	44
Abb. 11:	Freisetzung von IL-1 β , -6 und -8 durch PMN, die für 18 h mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an LVX, DPT und CLI inkubiert wurden.	45
Abb. 12:	SEM-Aufnahmen einer PPy-beschichteten SPME-Sonde: Übergang zwischen dem Trägermaterial und der Polymerbeschichtung (links), Draufsicht auf die PPy-Beschichtung (Mitte), Aufnahme einer einzelnen Pore und der PPy-Partikel (rechts).	46
Abb. 13:	Einfluss der Beschichtungslänge und -masse an PPy auf die Extraktionsausbeute von 15,0 mg/L LNZ aus PBS.	47
Abb. 14:	Einfluss der Adsorptionszeit auf die Extraktionsausbeuten von vier verschiedenen SPME-Fasern für C_{max} an DPT (37,0 μ mol/L) und LVX (13,8 μ mol/L) aus PBS sowie von SRL (0,11 μ mol/L) aus humanem Vollblut.	48

Abb. 15:	Einfluss der Desorptionszeit auf die Extraktionsausbeute von C_{\max} an DPT (37,0 $\mu\text{mol/L}$) nach Adsorption aus PBS.	50
Abb. 16:	Einfluss von Blutantikoagulantien (Natriumzitrat, Heparin, EDTA), Natriumchlorid-Konzentration sowie des pH-Wertes auf die Extraktionsausbeute von 15,0 mg/L LNZ aus Plasma mittels PPy-beschichteten SPME-Sonden.	52
Abb. 17:	Einfluss der Blutantikoagulantien EDTA und Heparin auf die Extraktion von SRL aus Vollblut mittels PAN-C18-beschichteten SPME-Sonden.	53
Abb. 18:	Effekt von variierten Flussraten des Vollblutes auf die Extraktionsausbeuten von LNZ (5,0 bzw. 15,0 mg/L) und DPT (20,0 bzw. 60,0 mg/L) mittels PPy-beschichteten Fasern (HLM-Modell), Normierung der Extraktionsausbeuten auf 5,0 mg/L LNZ bzw. 20,0 mg/L DPT bei 100 mL/min.	54
Abb. 19:	Normierte SPM-Extraktionsausbeute von LNZ ($C = 1,0 - 15,0 \text{ mg/L}$) und DPT ($C = 4,0 - 60,0 \text{ mg/L}$) mittels PPy-beschichteten Fasern (HLM-Modell) aus Heparin-antikoaguliertem Vollblut, Normierung der Extraktionsausbeuten auf 5,0 mg/L LNZ bzw. 20,0 mg/L DPT.	56
Abb. 20:	Extraktionsausbeuten für SRL (25 – 300 $\mu\text{g/L}$) aus fließendem Heparin-antikoaguliertem Vollblut durch neue unbenutzte und zuvor bereits benutzte PTh- bzw. PPy-beschichtete SPME-Fasern bei einer Flussrate von 100 mL/min.	57
Abb. 21:	SPM-Extraktionsprofile von C_{\max} an DPT (60,0 mg/L) aus Matrices mit unterschiedlichem Proteingehalt.	58
Abb. 22:	Mögliche Verläufe der mittels SPME-Sonden (PPy, PTh, PAN-C18) bestimmten Plasmaproteinbindungen (PPB) von C_{\max} an DPT (60,0 mg/L) in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Adsorptionslösungen; <i>Einschub</i> : Verlauf der PPB in Abhängigkeit von der Adsorptionszeit (5 – 60 min) von C_{\max} an DPT (60,0 mg/L) aus Heparin-Plasma mittels PPy- und PAN-C18-beschichteten Sonden.	60
Abb. 23:	Verlauf der mittels SPME (PPy, PTh, PEDOT, PAN-C18) extrahierten C_{LVX} nach Adsorption (60 min) von C_{\max} an LVX (5,0 mg/L) aus Matrices mit unterschiedlichem Proteingehalt.	61
Abb. 24:	Mittels UF (10 kDa Nanosep-Filtern) bestimmte PPB von DPT ($C = 20 - 140 \text{ mg/L}$) in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Matrix.	63
Abb. 25:	Zwei mögliche Verläufe der mittels UF erzielten PPB für $2 \times C_{\max}$ an DPT (120 mg/L) in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Matrix.	64
Abb. 26:	Wirkmechanismus von DPT in Gram-positiven Bakterien.	69
Abb. 27:	Schematische Darstellung der Extraktionsausbeuten (EA) in Abhängigkeit von der Adsorptionszeit (t): Phase I spiegelt den Bereich wider, in den Abweichungen von der Adsorptionszeit einen deutlichen Einfluss auf die EA besitzen, in Phase II und III sinkt der Einfluss bis in Phase III geringe Zeitabweichungen keine deutlichen Unterschiede in den EA bewirken.	78
Abb. 28:	Gegenüberstellung der mittels PTh- und PPy-beschichteten SPME – Fasern extrahierten freien C_{SRL} mit den theoretisch freien C_{SRL} .	81
Abb. 29:	Vergleich der erzielten PPB für $0,5 \times C_{\max}$, C_{\max} und $2 \times C_{\max}$ an DPT aus heparinisiertem Plasma, die durch die SPME mit drei differenten Fasern (PPy, PTh, und PAN-C18) und mit UF erzielt wurden, mit Literaturdaten.	85

Abb. 30:	Vergleich der erzielten PPB für 0,5x C _{max} , C _{max} und 2x C _{max} an LVX aus heparinisiertem Plasma, die durch die SPME mit drei differenten Fasern (PPy, PEDOT, und PAN-C18) und mit UF erzielt wurden, mit Literaturdaten.	87
----------	---	----

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zusammenstellung ausgewählter Interleukine (IL) mit Angabe deren Herkunft und Funktion.	3
Tab. 2:	In den Studien verwendete Arzneistoffe: Angabe der Arzneistoffgruppen, Arzneistoffkategorien, Molgewichte und Strukturformeln.	12
Tab. 3:	Die <i>intra diem</i> und <i>inter dies</i> Messpräzisionen (Variationskoeffizient, CV) und -richtigkeiten (relativer Fehler, RE) wurden für DPT-haltige Kontrollen in Zitratplasma, die den niedrigen, mittleren und hohen therapeutischen Konzentrationsbereich repräsentieren, berechnet.	39
Tab. 4:	Gegenüberstellung der Massenkonzentrationen [mg/L] und Stoffmengenkonzentrationen [µmol/L] von DPT, LVX und SRL.	47
Tab. 5:	Zusammenstellung der extrapolierten Sättigungskonzentrationen für die SPME von C _{max} an DPT (37,0 µmol/L), LVX (13,8 µmol/L) und SRL (0,11 µmol/L) unter Verwendung von vier verschiedenen Faserbeschichtungen sowie Angabe der Adsorptionszeiten, die zum Erreichen der Sättigungskonzentrationen erforderlich sind.	49
Tab. 6:	Angabe der Desorptionszeiten, die zum Erreichen der Sättigungskonzentration nach Adsorption von C _{max} an DPT (37,0 µmol/L) aus PBS erforderlich waren sowie Angabe der kalkulierten reduzierten Desorptionszeiten, für die ein Verlust von 5 % der Extraktionsausbeute an DPT akzeptiert wurde.	51
Tab. 7:	Extrahierte Konzentrationen an SRL mit PTh-beschichteten Sonden aus Vollblut unter Variation der Bewegungsart des Vollblutes.	53
Tab. 8:	Zusammenstellung der Bestimmtheitsmaße und Messpräzisionen (Variationskoeffizient, CV _{maximal}) für die SPME von LNZ (1 - 15 mg/L), DPT (3 - 60 mg/L) und SRL (25 - 300 µg/L) aus Heparin-antikoaguliertem Vollblut mittels PPy- und PTh-beschichteten Fasern. Aufschlüsselung der Ergebnisse nach Faserstatus und Agitationsmodus.	55
Tab. 9:	Zusammenstellung der berechneten Unterschiede zwischen den Extraktionsausbeuten in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Adsorptionslösungen und der Art der Faserbeschichtungen.	59
Tab. 10:	Berechnete PPB nach SPME (60 min) von zwei C _{DPT} aus Heparin-Plasma mittels PPy-, PTh- und PAN-C18-beschichteten Sonden.	60
Tab. 11:	Zusammenstellung der berechneten Unterschiede zwischen den Extraktionsausbeuten in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Adsorptionslösung und der Art der Faserbeschichtung.	62
Tab. 12:	Zusammenstellung der berechneten Unterschiede zwischen den Extraktionsausbeuten in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Adsorptionslösung; erzielt durch UF.	63
Tab. 13:	Gegenüberstellung der Mindestinhibierungskonzentrationen (MIC ₉₀) für DPT, Vancomycin und LNZ hinsichtlich vier relevanter Bakterienarten.	70

Gleichungsverzeichnis

Gleichung 1:	Berechnung der extrahierten Masse des Analyten.	9
Gleichung 2:	Vereinfachte Berechnung der extrahierten Analytmasse bei großem Probenvolumen.	10
Gleichung 3:	Berechnung der zellassozierten Arzneistoffkonzentration.	21
Gleichung 4:	Berechnung der Migrationsindizes der PMN nach Inkubation mit den Antibiotika.	22
Gleichung 5:	Berechnung der mittels SPME erhaltenen PPB.	29
Gleichung 6:	Berechnung der mittels UF erhaltenen PPB.	30

Abkürzungsverzeichnis

μg , μL , μm	Mikrogramm, -liter, -meter
\varnothing	Durchmesser
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
BI	„Oxidative Burst“-Index
C	Konzentration
Ca^{2+}	Calcium-Ionen
CH_3OH	Methanol
CI	chemotaktischer Index
$C_{\text{zellassoziiert}}/C_{\text{extrazellulär}}$	Quotient aus den zellassoziierten (bzw. intrazellulären) und extrazellulären Konzentrationen eines Antibiotikums
CLI	Clindamycin
cm	Zentimeter
C_{max}	maximale therapeutische Plasmakonzentration, die im Verlauf einer Arzneistofftherapie erreicht wird
CV	Variationskoeffizient
DMR	32-Desmethoxyrapamycin
DPT	Daptomycin
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FITC- <i>E.coli</i>	Fluorescein-Isothiocyanat-markierte <i>Escherichia coli</i>
fMLP	N-Formyl-methionin-leucin-phenylalanin
h	Stunde
HLM	Herz-Lungen-Maschine
H_2O	Wasser
HPLC	High-performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssig-chromatographie)
H_3PO_4	Phosphorsäure
i.d.	innerer Durchmesser
IL	Interleukin
IS	Interner Standard
K^+	Kalium-Ion
L	Liter
l	Länge
LI	Lokomotion-Index
LLE	Liquid liquid extraction (Flüssig-Flüssig-Extraktion)
LNZ	Linezolid
LVX	Levofloxacin
M	Molgewicht
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mg^{2+}	Magnesium-Ionen
mg, mL, mm	Milligramm, -liter, -meter
MI	Migrationsindex

min	Minute
MRP	Multiple resistance protein
MRM	Multiple reaction monitoring
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MS/MS	Tandemmassenspektrometer
MW	Mittelwert
m/z	Masse/Ladung
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
nm	Nanometer
PAN-C18	Polyacrylnitril-C18
PBS	Phosphate buffer solution (Phosphatpufferlösung)
PEDOT	Poly(3,4-ethylendioxythiophen)
PI	Phagozytose-Index
PKC	Proteinkinase C
PMA	13-Phorbol-12-myristatacetat
PMN	polymorphkernige Neutrophile
PPB	Plasmaproteinbindung
PPy	Polypyrrol
PTh	Polythiophen
SEM	Scanning electron microscopy
SPE	Solid-phase extraction (Festphasenextraktion)
SPME	Solid-phase microextraction (Festphasenmikroextraktion)
SRL	Sirolimus
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TDM	Therapeutic drug monitoring
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
UF	Ultrafiltration
UV/Vis	ultravioletter/visueller Lichtbereich
VRE	Vancomycin-resistente <i>Enterococcus</i>
ZAS	Zymosan-aktiviertes Meerschweinchenserum

1 Einleitung

Der Mensch ist stets von einer Vielzahl an Bakterien umgeben, von denen einige schädliche Wirkungen auf den humanen Organismus besitzen können, während andere Bakterienarten im menschlichen Körper wichtige Aufgaben beispielsweise in der Verdauung von Nahrungsmitteln erfüllen.

Wenn es im menschlichen Körper jedoch zu einem Befall mit mikrobiellen oder toxischen Erregern (Bakterien, Pilzen) kommt, wird in Form einer Entzündungskaskade eine lokale inflammatorische Reaktion des Immunsystems in Gang gesetzt, die die Pathogene unschädlich machen soll¹. In diesem Zusammenhang stellen die humanen polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) eine der wichtigsten Zellarten dar, da diese unmittelbar und frühzeitig mit den Erregern konfrontiert werden und aufgrund ihrer phagozytären Eigenschaften eine wichtige Säule der primären Immunabwehr des menschlichen Organismus bilden²⁻⁴. PMN bilden mit 40 – 75 % die größte Fraktion der Leukozyten im menschlichen Blut²⁻⁴.

Unmittelbar nachdem Pathogene ins menschliche Immunsystem eingedrungen sind, wird eine lokale inflammatorische Reaktion des Immunsystems durch örtlich vorkommende Makrophagen, nekrotische Zellen, Plasmafaktoren und mikrobielle Produkte ausgelöst¹. Die lokal produzierten inflammatorischen und mikrobiellen Faktoren wie Interleukine und aktivierte Komplementproteine erzeugen einen chemotaktischen Gradienten, modifizieren die Membranrezeptoren der Endothelzellen und begünstigen eine Verlangsamung des Blutflusses in den Venen^{1, 5}. Während der Wanderung von Neutrophilen in den Venen bewegen sich die PMN entlang der Oberflächen der Endothelzellen und interagieren normalerweise nur über schwache Adhäsionskräfte mit den Endothelzellen. Infolge des chemotaktischen Gradienten sowie der zellulären Signale werden die PMN jedoch aktiviert und über Selektine stärker an die Endothelzellen gebunden, wodurch eine transendotheläre Migration der PMN in Richtung des entzündlichen Geschehens im extravaskulären Gewebe ermöglicht wird^{1, 6} (Abb. 1). Nachdem die PMN entlang des chemotaktischen Gradienten zum Ort des entzündlichen Geschehens gewandert

(Chemotaxis) sind, erfolgt über spezifische Membranrezeptoren eine Erkennung der Pathogene. Anschließend werden die Pathogene durch Ausstülpungen der Membran („Pseudopods“) umschlossen und in Form einer Vakuole in die PMN eingeschlossen (Phagozytose). Durch eine parallele Aktivierung der Freisetzung von granulozytären Bestandteilen und des „Oxidative Burst“ werden die Pathogene dann unschädlich gemacht^{1, 7}. Beim „Oxidative Burst“ kommt es infolge der Aktivierung der NADPH-Oxidase und des Verbrauches von Sauerstoff (O_2) zur Bildung von anionischen und radikalischen Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen sowie die Freisetzung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Eine schnelle Bildung und Freisetzung dieser einzelnen Verbindungen in Kombination mit den in PMN intrazellulär vorkommenden proteolytischen Enzymen bildet ein effektives antimikrobielles System gegen eine Vielzahl von körperfremden Pathogenen^{3, 6-8}. Die einzelnen zellspezifischen Funktionen der PMN sind dabei äußerst komplex und bedürfen auf der Rezeptor- und Postrezeptor-Ebene einer unterschiedlichen Regulation⁹. Nach der Aufnahme und Zerstörung von Pathogenen sterben die PMN innerhalb von 72 h durch den Prozess der Apoptose (programmierter Zelltod)¹⁰⁻¹².

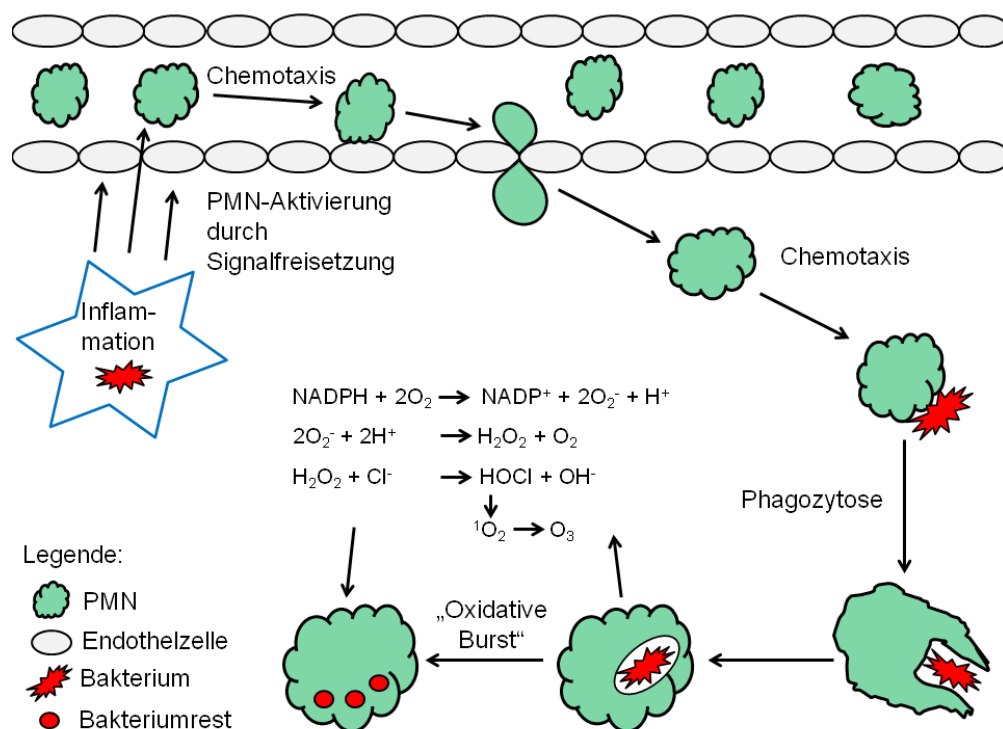


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der zellspezifischen Funktionen Aktivierung, Chemotaxis, Phagozytose und „Oxidative Burst“ von humanen PMN infolge einer bakteriellen Infektion^{1, 7}.

Während des gesamten Prozesses kommt es zur Freisetzung von Interleukinen (IL; Peptidhormone), einer Untergruppe der Zytokine, die für die Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems eine hohe Relevanz besitzen. In der Tabelle 1 sind für ausgewählte Interleukine die Herkunft und Funktionen zusammengefasst¹³⁻²².

Interleukin	Herkunft und Funktion
IL-1 β	Sekretion durch Makrophagen, Monozyten und Fibroblasten. Aktivierung von T- und B-Zellen.
IL-2	Sekretion durch aktivierte T-Zellen und TH1-Zellen. Zugehörigkeit zur Gruppe der Wachstumsfaktoren. Anregung der Proliferation und Differenzierung von B- und T-Zellen, Stimulation der Produktion verschiedener Interleukine und der Zytotoxizität in aktivierten Makrophagen.
IL-4	Sekretion durch T-Zellen und Mastzellen. Antiinflammatorische Eigenschaften. Steigerung der Immunglobulinsynthese, Verringerung der Produktion von TH1-Zellen, Makrophagen und IL-12.
IL-6	Sekretion durch Makrophagen und Fibroblasten. Aktivierung und Regulation der Proliferation und Differenzierung von B-Zellen, Schlüsselrolle beim Übergang von der angeborenen zur erworbenen Immunität, Begrenzung der Akkumulation neutrophiler Granulozyten im entzündlichen Gewebe, Regulation der Apoptose der Leukozyten.
IL-8	Sekretion durch T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten. Zugehörigkeit zur Gruppe der Chemokine. Förderung der Aktivierung, Adhäsion und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, Anregung der Expression von Adhäsionsmolekülen, Aktivierung der Freisetzung von Sauerstoffradikalen.
IL-10	Sekretion durch TH0- und TH2-Zellen sowie durch Makrophagen. Antiinflammatorische Eigenschaften (Hemmung der Makrophagenfunktionen und überschießender Entzündungsreaktionen), Aktivierung und Proliferation von B-Zellen, Hemmung der Bildung unterschiedlicher Interleukine.
IL-12	Sekretion durch Makrophagen und B-Zellen. Zentrale Funktion in der zellulären Abwehr und Förderung von T-Killerzellen, in einem Tumor einzudringen und diesen zu zerstören.
TNF- α	Sekretion durch Makrophagen, T-Zellen und TH1-Zellen. Stimulation und Hemmung von Tumorzellen möglich, wichtiger Entzündungsmediator, Zytolyse von transformierten Zellen.

Tab. 1: Zusammenstellung ausgewählter Interleukine (IL) mit Angabe deren Herkunft und Funktion.

Über die gesteigerte oder unterdrückte Freisetzung von Interleukinen durch die PMN können weitere Zellen zum Ort des entzündlichen Geschehens gelockt werden und somit die Immunabwehr angeregt werden^{13-19, 21, 22}. Da viele Interleukine von mehr als einer Zellart gebildet werden, aber nicht jede Zelle die gleichen Interleukine freisetzt, ist der Effekt von Arzneistoffen (zum Beispiel Fluorchinolonen) auf die Sekretion von Interleukinen nicht einheitlich, sondern variiert in Abhängigkeit vom Zelltyp und den betrachteten Interleukinen²³.

Bei einem sehr starken Befall des Organismus mit Bakterien ist es häufig erforderlich, Arzneistoffe (Antibiotika) einzusetzen, die die PMN darin unterstützen sollen, die Erreger unschädlich zu machen. Dabei können durch die Applikation von Arzneistoffen Einschränkungen in wichtigen PMN-Funktionen (Viabilitätsverlust, Inhibierung der Phagozytose, des „Oxidative Bursts“ und der Interleukinsekretion) resultieren^{10, 24, 25}. Im Gegensatz kann die Applikation eines Arzneistoffes auch ohne eine relevante Beeinflussung der PMN-Funktionen bleiben, wie es am Beispiel des Oxazolidinon-Antibiotikums Linezolid in der Fachliteratur beschrieben ist^{26, 27}. Unterstützend in der Bekämpfung von Erregern kann die Aufnahme und Anreicherung von antimikrobiellen Arzneistoffen (zum Beispiel Fluorchinolonen) in Phagozyten und somit ein direkter Transport zum Entzündungsort sein; zwei wichtige Faktoren der pharmakologischen Effektivität dieser Arzneistoffe gegenüber intrazellulär vorkommenden Pathogenen².

Für die Ermittlung der pharmako- und eventuell toxikologischen Wirkung eines Arzneistoffes auf den menschlichen Organismus werden präklinische und klinische Studien entsprechend dem Stufenplan nach §4 und §63 des deutschen Arzneimittelgesetzes²⁸ durchgeführt. Im Rahmen der präklinischen Studien²⁹⁻³² erfolgen *in vitro* Untersuchungen an humanen Blutzellen^{3, 17, 33-40} und/oder *in vivo* Untersuchungen am Tiermodell^{32, 41-43}. Auch in diesem Zusammenhang zählen die humanen PMN zu den wichtigsten Zellarten, da sie eine der ersten Zellen sind, die mit Xenobiotika in Kontakt kommen und darüber hinaus einfach zu isolieren sind²⁻⁴. Die Anreicherung von Fluorchinolonen in Zellen (PMN, THP1-Monocyten, Makrophagen) wurde beispielsweise bereits früher beschrieben^{33, 34, 36, 38, 44-51}. Allerdings gibt es bis heute kaum

Untersuchungen zur zellassozierten Aufnahme von Fluorchinolonen in PMN und dessen Wirkung auf mehrere spezifische Zellfunktionen. In einer der wenigen Arbeiten beschäftigte sich Mandell⁴⁴ mit der intrazellulären Aufnahme von Levofloxacin (LVX) und dessen Einfluss auf die Chemotaxis. Deutlich weniger Arbeiten beschäftigten sich mit der Ermittlung des Einflusses von Arzneistoffen auf andere Primärzellen (Epithelzellen, Krebszellen der Lunge) oder kultivierte Zellarten (HL60-Zellen)^{37, 38, 52, 53}.

Die pharmakologische Effektivität eines Arzneistoffes im menschlichen Körper wird sowohl durch dessen Pharmakokinetik (PK) als auch dessen Pharmakodynamik (PD) geprägt⁵⁴. Die Lehre der PK befasst sich mit der Konzentrationsänderung eines Pharmakons im Organismus in Abhängigkeit von der Zeit und beschreibt grundlegende Prozesse wie die Freisetzung (Liberation), Aufnahme (Absorption), Verteilung (Distribution), Umwandlung/Abbau (Metabolisierung) und Ausscheidung (Exkretion) des Wirkstoffes im menschlichen Körper (LADME-Prinzip). Dem gegenüber steht die PD, welche Vorgänge beschreibt, die zur pharmakologischen Wirkung eines Arzneistoffes führen, wie z.B. die Bindung eines Arzneistoffes an seine physiologischen Zielstrukturen (Rezeptoren, Transporter, Enzyme) sowie deren Aktivierungs- und Umwandlungsprozesse^{20, 54}.

Hinsichtlich einer Beurteilung der pharmakologischen Effektivität eines Arzneistoffes im menschlichen Körper wurden Konzepte etabliert, die eine zusammenhängende Betrachtung der PK und PD eines Arzneistoffes beinhalten (PK/PD – Modelle). Dabei werden im Falle von Antiinfektiva derzeit insbesondere die Verhältnisse zwischen den in einer Therapie maximal erreichten Blutkonzentrationen (C_{max}) beziehungsweise der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) und der Mindestinhibierungskonzentration (MIC) des Arzneistoffes gegenüber den betrachteten Pathogenen für die Vorhersage einer therapeutischen Wirksamkeit diskutiert (C_{max}/MIC oder AUC/MIC – Modelle)^{55, 56}. Darüber hinaus wird auch das prozentuale Zeitintervall, in der die Arzneistoffkonzentration oberhalb der MIC liegt ($\%T_{max}/MIC$), als Parameter für eine Vorhersage der antimikrobiellen Effektivität diskutiert, wobei für einzelne Arzneistoffklassen verschiedene PK/PD – Modelle Anwendung finden⁵⁶. So wird für

Aminoglykoside das Modell C_{\max}/MIC , für Penicilline und Cephalosporine das $\%T_{\max}/\text{MIC}$ – Modell und für Glykopeptide die Korrelation zwischen der AUC und der MIC betrachtet. Für einige ausgewählte Arzneistoffgruppen wie den Fluorchinolonen kann es erforderlich sein, differenzierte Korrelationsbetrachtungen durchzuführen (C_{\max}/MIC und/oder AUC/MIC)⁵⁷.

Für eine Beurteilung der antimikrobiellen Effektivität eines Arzneistoffes in der Behandlung von Infektionen mit resistenten Keimen oder sich schnell ausbreitenden Infektionen ist es nahezu unabdingbar, die Arzneistoffkonzentration am Infektionsort zu kennen. Diese Arzneistoffkonzentration hängt aber von der Verteilung eines Arzneistoffes im Blut und Gewebe ab, welche durch die physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffes (Lipophilie, Hydrophilie, Polarität, Bindung an Matrixbestandteile wie Proteine und/oder Zellen) beeinflusst wird²⁰. Insbesondere die Kenntnis über die ‚freie‘, d.h. nicht an Matrixbestandteile wie Zellen und Proteine gebundene Arzneistoffkonzentration ist dabei von hoher klinischer Relevanz, um die arzneistoffbedingte Toxizität zu minimieren und die pharmakologische Effektivität in der Arzneistofftherapie zu erhöhen^{58, 59}.

Die Hypothese, dass die pharmakologische Aktivität eines Arzneistoffes durch die ‚freie‘ Arzneistoffkonzentration hervorgerufen wird, wurde 1979 von Israili⁶⁰ eingeführt. Diese Hypothese beruht auf der Annahme, dass die Plasmaproteinbindung (PPB) die Verteilung eines Arzneistoffes im Körper und die Bindung an die Zielstrukturen begrenzen kann⁵⁴. Es ist bekannt, dass die PPB sowohl die PK als auch PD und somit die antimikrobielle Aktivität des Arzneistoffes beeinflussen kann⁶¹⁻⁷². Beispielsweise kann es bezüglich der PK zu Veränderungen in der Halbwertszeit, des Verteilungsvolumens und der Clearance in Abhängigkeit von der PPB kommen^{54, 73, 74}.

Im menschlichen Vollblut binden Arzneistoffe an Albumin, α_1 -Glykoproteine, Lipoproteine, Erythrozyten sowie α -, β - und γ -Globuline, wobei Albumin und α_1 -Glykoproteine die Hauptbindungsproteine darstellen^{54, 75-78}. Albumin, welches mit 50 – 60 % (35 – 50 g/L) die größte Fraktion der Plasmaproteine bildet, wird in der Leber gebildet, ist ein

Transportprotein für eine Vielzahl an endogenen und exogenen Verbindungen und besitzt eine wichtige physiologische Funktion bei der Stabilisierung des pH-Wertes des Blutes⁷⁹. Albumin ist hauptsächlich für die Bindung von aziden Arzneistoffen verantwortlich^{54, 80-82}. α_1 -Glykoproteine sind hingegen hauptsächlich in die Bindung von neutralen und basischen Arzneistoffen involviert^{54, 77, 83, 84}. Neben ihrer Funktion als Transportproteine werden α_1 -Glykoproteine als antiinflammatorische und immunmodulierende Verbindungen betrachtet, die bei Entzündungen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle einnehmen^{54, 77, 85}.

Verschiedene Krankheiten können ebenfalls einen Einfluss auf die pharmakologische Effektivität einer Arzneistofftherapie haben. Infolge einer Hypoalbuminämie (Herabsetzung des Gehaltes an Albumin) kann ein Anstieg in der ‚freien‘ und somit wirksamen Arzneistoffkonzentration resultieren, was insbesondere für Arzneistoffe mit einer hohen PPB (> 80 %) in der Therapie zu berücksichtigen ist⁸⁶⁻⁹⁰. Einschränkungen in der renalen Ausscheidung und Erkrankungen der Leber können ebenfalls zu einer verringerten Bindungsrate der Arzneistoffe an Proteine führen⁸⁷. Bei rheumatischen Entzündungen kommt es zunächst zur Herabsetzung der Albuminkonzentration, jedoch findet häufig eine konkurrierende Zunahme der Konzentrationen an verschiedenen Globulinen und Glykoproteinen statt, wodurch eine gesteigerte Bindung der Arzneistoffe an diese Proteine und somit eine verringerte ‚freie‘ Arzneistoffkonzentration resultieren können⁸⁷. Ähnliche Prozesse lassen sich auch für ältere oder schwangere Patienten beobachten⁸¹.

Zu den in der Fachliteratur beschriebenen Methoden für die Bestimmung der PPB eines Arzneistoffes zählen die Mikrodialyse, Gleichgewichtsdialyse, dynamische Dialyse, Gelfiltration, Ultrafiltration, Ultrazentrifugation, Elektrophorese sowie spektrometrische und enzymkinetische Methoden^{54, 78, 91-95}. Da viele der genannten Methoden material- und zeitintensiv sind oder spezielle analytische Techniken bedürfen, die nicht in jedem Routinelabor vorhanden sind, haben sich hauptsächlich die Mikrodialyse, die Gleichgewichtsdialyse und die Ultrafiltration zur Bestimmung der PPB in der Praxis etabliert⁷⁸.

Die Probenvorbereitung stellt einen kritischen und entscheidenden Schritt in der Arzneistoffanalyse dar, da die direkte chromatographische Bestimmung von Arzneistoffen aus biologischen Matrices wie humanem Vollblut oder antikoaguliertem Plasma ohne weitere Probenaufarbeitung aufgrund von störenden Einflüssen der Matrix, welche unter anderem aus Proteinen, Lipiden und Sacchariden besteht, nicht möglich ist⁹⁶⁻⁹⁸. Der Einsatz von einfachen und schnellen bioanalytischen Methoden scheitert aber häufig an komplizierten sowie material- und zeitaufwendigen Probenvorbereitungsmethoden wie der Festphasenextraktion (Solid-Phase Extraction, SPE) oder der Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid-Liquid Extraction, LLE). Zu den etablierten Probenvorbereitungsmethoden zählen darüber hinaus oft mehrstufige Verfahren, die unter anderem aus den folgenden Schritten bestehen können: Verdünnungen, Fällungen, Filtrationen und/oder Zentrifugationsprozesse⁹⁶⁻⁹⁸. Ein Nachteil der SPE und LLE ist, dass diese Methoden nur den Gesamtanteil eines Arzneistoffes („freier“ + an Matrixbestandteile gebundener Anteil) aus der Matrix isolieren, wodurch eine Einsatzmöglichkeit der SPE und LLE für die Bestimmung der PPB nicht gegeben ist. Die Festphasenmikroextraktion (Solid-Phase Microextraction, SPME) ist eine relativ neue und innovative Probenvorbereitungsmethode für die Bestimmung von Arzneistoffen aus biologischen Matrices (Vollblut, Plasma), die nur den freien Arzneistoffanteil extrahiert und somit diese Limitation umgeht⁹⁹⁻¹⁰¹.

1.1 Festphasenmikroextraktion (Solid-Phase Microextraction, SPME)

Die Festphasenmikroextraktion (Solid-Phase Microextraction, SPME), welche Ende der 1980er Jahre von Pawliszyn et al. eingeführt wurde, ist eine innovative, einfache, schnelle und lösungsmittelarme Methode zur Bestimmung von „freien“ Arzneistoffkonzentrationen aus humanen Matrices^{98, 102-105} und von anderen Verbindungen aus Gasen und Gewässern^{99-101, 106-108}. Die Methode der SPME, welche mit Polymeren beschichtete Materialien als Extraktionsfasern benutzt, integriert Extraktion, Isolation und Anreicherung des Zielanalyten in einem Schritt^{98, 100, 101}. Für eine reproduzierbare Extraktionsleistung der SPME-Fasern ist die Einstellung von Gleichgewichten innerhalb von Minuten bis zu einigen Stunden (in Abhängigkeit vom Analyten)¹⁰⁹ von entscheidender Bedeutung. Diese Gleichgewichte werden in biologischen Matrices durch die Affinitäten des Arzneistoffes

zum Protein einerseits, beziehungsweise zum Beschichtungsmaterial der SPME-Sonde andererseits, geprägt. Ebenfalls ist es erforderlich, zwischen einer „headspace“ (SPME von leichtflüchtigen und flüchtigen Analyten aus der Gasphase) und einer „direct immersion“ (SPME von Verbindungen aus einer flüssigen Phase) Extraktion zu unterscheiden^{105, 109}. Nach einer thermischen oder lösungsmittelvermittelten Desorption der Analyten vom Beschichtungsmaterial kann oft ohne weitere Probenaufarbeitung eine zum freien Arzneistoffanteil proportionale Konzentration direkt ermittelt werden (Abb. 2)^{105, 110, 111}.

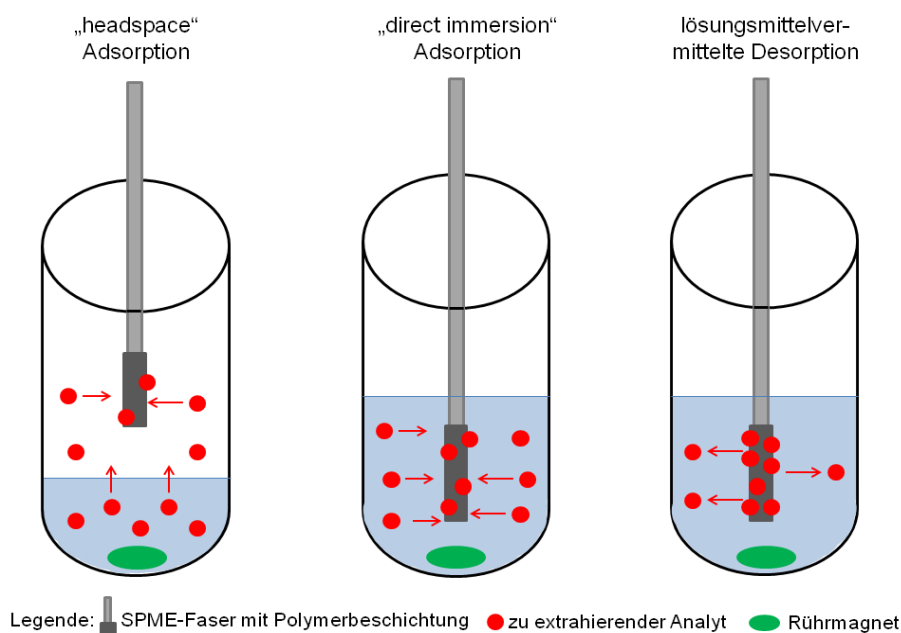


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung des „Arbeitsprinzipes“ der SPME^{105, 110, 111}.

Der Mikroextraktionsprozess wird dabei als vollständig beendet betrachtet, wenn zwischen der Analytkonzentration in der eingesetzten Analytlösung und der adsorbierten Menge am Beschichtungsmaterial ein Gleichgewicht erreicht ist^{110, 111}. Die extrahierte Stoffmenge im Gleichgewichtszustand (n_e) kann dann über die nachfolgende Gleichung 1 berechnet werden:

$$n_e = (K_{fs} \cdot V_s \cdot V_f \cdot C_0) / (K_{fs} \cdot V_f + V_s)$$

Gleichung 1: Berechnung der extrahierten Masse des Analyten^{110, 111}.

mit folgenden Abkürzungsbedeutungen:

- n_e - extrahierte Masse des Analyten im Gleichgewichtszustand
- V_s - Volumen der eingesetzten Analytlösung
- V_f - Volumen des Beschichtungsmaterials
- C_0 - Konzentration des Analyten in der Analytlösung
- K_{fs} - Verteilungskoeffizient des Analyten zwischen der Probenmatrix und dem Beschichtungsmaterial

Aus Gleichung 1 ist erkennbar, dass die extrahierte Masse des Analyten (n_e) direkt proportional zu der Anfangskonzentration des Analyten (C_0) ist, was die Grundlage für eine quantitative Bestimmung mittels SPME-Analytik bildet¹¹⁰. Wenn das Volumen der Probenlösung deutlich größer als das Volumen des Beschichtungsmaterials ist, gilt $V_s \gg K_{fs} \cdot V_f$ und die Gleichung 1 kann vereinfacht werden (Gleichung 2)^{110, 111}:

$$n_e = K_{fs} \cdot V_f \cdot C_0$$

Gleichung 2: Vereinfachte Berechnung der extrahierten Analytmasse bei großem Porbenvolumen^{110, 111}.

Die Extraktionsleistung der SPME ist von verschiedenen Parametern abhängig. Dabei lassen sich die einflussausübenden Parameter in zwei wesentliche Gruppen teilen: zum einen Kenngrößen, die die experimentelle Durchführung betreffen, und zum anderen die Materialauswahl der Faserbeschichtung und somit die Interaktionsfähigkeit zwischen Analyt und Beschichtungsmaterial. Zu den Durchführungsparametern, die theoretisch einen Einfluss auf die Extraktionsausbeuten der Fasern für bestimmte Analyte besitzen, zählen der pH – Wert, die Polarität der Lösung, der Zusatz von Salzen, der Bewegungsmodus, die Desorptionsart und –matrix sowie die Extraktionstemperaturen und –zeiten^{98, 110-115}. Weitere wichtige Kenngrößen sind die Art, Dicke und Polarität der Faserbeschichtung, die einen deutlichen Einfluss auf die Extraktionsausbeuten haben können^{98, 111, 115}. Da die Einflüsse der einzelnen Parameter für verschiedene Verbindungen und Verbindungsklassen unterschiedlich ausfallen können, ist es erforderlich, die SPME – Durchführungsparameter für einzelne Verbindungen zu optimieren.

Eine Vielzahl an unterschiedlichen Beschichtungsmaterialien ist käuflich erhältlich. Zu diesen Beschichtungsmaterialien zählen Polydimethylsiloxan, Polyacrylat, Polydimethylsiloxan-Divinylbenzen, Carboxen-Polydimethylsiloxan, Carbowax- Divinylbenzen, Polyacrylnitril-C18 und C18^{100, 104}, deren Eignung aufgrund der physikochemischen Eigenschaften für verschiedene Verbindungen voneinander variieren kann. Häufig verwendete Beschichtungsdicken liegen zwischen 45 µm und 100 µm^{100, 104}. International publizierte Forschungsarbeiten beschäftigen sich darüber hinaus mit der SPME unter Verwendung von Polypyrrol- und Polythiophen-Beschichtungen, die durch elektrochemische Abscheidung auf einem Trägermaterial (zum Beispiel chirurgischer Edelstahldraht) erzielt werden^{98, 102, 103, 116}.

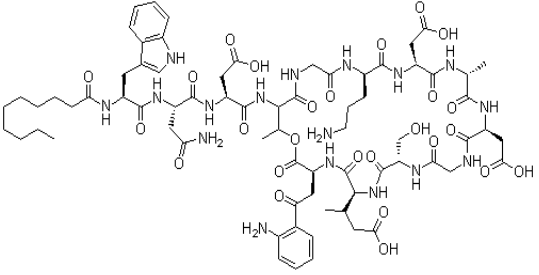
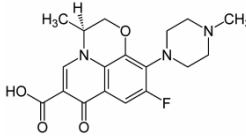
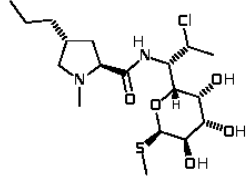
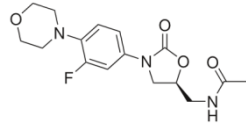
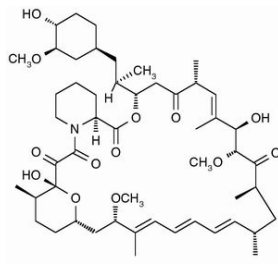
Bis heute ist die SPME für die Extraktion von Verbindungen aus verschiedenen biologischen Matrices wie Vollblut, Plasma, Urin und Atemgas sowie aus natürlichen Produkten und Umweltproben (Gewässer, Böden) eingesetzt worden^{98, 103, 104, 109, 117-120}.

1.2 Untersuchte antimikrobielle Arzneistoffe

In den durchgeführten PMN- beziehungsweise SPME-Studien wurden Arzneistoffe mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften aber hohen klinischen Relevanzen eingesetzt, von denen in der Tabelle 2 die Arzneistoffgruppe und -kategorie sowie die Molgewichte und die chemischen Strukturen angegeben sind.

1.2.1 Daptomycin (DPT)

DPT gehört zur Gruppe der zyklischen Lipopeptid-Antibiotika und wird unter anderem zur Behandlung von komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen eingesetzt. Aufgrund seiner schnellen und konzentrationsabhängigen antibakteriellen Wirksamkeit gegen Gram-positive Keime wie Methicillin- oder Vancomycin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA, VRSA) und Vancomycin-resistente *Enterococcus* (VRE) sowie eines sehr geringen Resistenzpotentials bei einem hohen Sicherheitsprofil, besitzt DPT eine große klinische Relevanz¹²¹⁻¹²⁵. DPT zeigt einen signifikanten postantibiotischen Effekt und besitzt eine hohe PPB von 90 – 94 %¹²¹, wodurch die PK von DPT im Blut und die Verteilung in tiefere Kompartimente durch Änderungen im Bindungsgrad an Proteine, wie

<p>Daptomycin (DPT)</p> <p>zyklisches Lipopeptid, Antibiotikum</p> <p>M = 1619,7 g/mol</p>	 <p>(Strukturformel: Steenbergen et al.¹²⁴)</p>
<p>Levofloxacin (LVX)</p> <p>Fluorchinolon, Antibiotikum</p> <p>M = 361,4 g/mol</p>	 <p>(Strukturformel: Wong et al.¹²⁶)</p>
<p>Clindamycin (CLI)</p> <p>Lincosamid, Antibiotikum</p> <p>M = 424,9 g/mol</p>	 <p>(Strukturformel: Cho et al.¹²⁷)</p>
<p>Linezolid (LNZ)</p> <p>Oxazolidinon, Antibiotikum</p> <p>M = 337,3 g/mol</p>	 <p>(Strukturformel: Toutain et al.¹²⁸)</p>
<p>Sirolimus (SRL)</p> <p>makrozyklisches Lakton, Immunsuppressivum</p> <p>M = 914,2 g/mol</p>	 <p>(Strukturformel: Stein et al.¹²⁹)</p>

Tab. 2: In den Untersuchungen verwendete Arzneistoffe: Angabe der Arzneistoffgruppen, Arzneistoffkategorien, Molgewichte und Strukturformeln.

es beispielsweise bei Leberinsuffizienzen auftreten kann, beeinflussbar sind. Die Elimination von DPT erfolgt hauptsächlich renal (78 %) und erfordert eine Dosisanpassung bei Patienten mit Nierenerkrankungen (Kreatinin-Clearance < 30 mL/min)¹²¹.

1.2.2 Levofloxacin (LVX)

LVX und D-Ofloxacin sind optisch aktive Isomere des racemischen Ofloxacin, einem Fluorchinolon. LVX, eines der beiden Isomere, besitzt im Vergleich zu Ofloxacin eine doppelt so große antimikrobielle Wirksamkeit^{34, 130}. LVX ist pharmakologisch aktiv gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, da es in Bakterien sowohl die DNA-Gyrase als auch die Topoisomerase IV unterdrückt¹³¹, wobei der Hauptwirkmechanismus vom Bakterientyp abhängig ist. Aufgrund seiner Wirksamkeit unter anderem gegen *Staphylococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* (*E. coli*) wird LVX gegen Infektionen der Atemwege und des Harntraktes sowie bei Haut- und Weichteilinfektionen eingesetzt¹³¹. LVX soll eine PPB von 24-38 % besitzen, wird hauptsächlich renal ausgeschieden und erfordert eine Dosisanpassung bei Patienten mit Niereninsuffizienz¹³¹⁻¹³³.

1.2.3 Clindamycin (CLI)

CLI ist das 7-Chlor-7-desoxy-derivat des Lincomycins, welches als Fermentationsprodukt von *Streptomyces lincolnensis* entsteht^{134, 135}. Obwohl die chemischen Strukturen der Makrolidantibiotika (z.B. Erythromycin), Lincosamide (Lincomycin, CLI) und Streptogramine unterschiedlich sind, besitzen sie den identischen Wirkmechanismus. Diese Antibiotika blockieren die Proteinsynthese in bestimmten Bakterienarten durch Unterdrückung der Peptidyltransferase-Reaktion an der 50(S)-Ribosom-Untereinheit¹³⁵. CLI ist wirksam gegen Gram-positive Bakterien, anaerobe Organismen sowie Mykoplasmen und wird infolge dessen zur Behandlung von Atemwegserkrankungen, Haut- und Weichteilinfektionen sowie von intra-abdominalen Entzündungen verwendet^{127, 136}. Die PPB von CLI wird mit ~94 % angegeben⁶³.

1.2.4 Linezolid (LNZ)

LNZ ist der erste Vertreter aus der Gruppe der Oxazolidinon-Antibiotika¹³⁷⁻¹³⁹. LNZ ist aktiv gegen Gram-positive Organismen und stellt eine Alternative zu den bekannten Streptogramin-Kombinationen, Ketoliden und Glykopeptiden dar. LNZ wird unter anderem zur Behandlung von komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen, die durch MRSA, Penicillin- und Cephalosporin-resistente *Pneumokokken* sowie VRE ausgelöst wurden, eingesetzt¹³⁹⁻¹⁴¹. LNZ wird nach peroraler Aufnahme schnell und nahezu vollständig resorbiert und besitzt eine PPB von ~30 %^{138, 142, 143}. Darüber hinaus zeigt LNZ eine gute Penetration in die äußeren Gefäßstellen¹⁴⁴. Aufgrund dieser Eigenschaften erwies LNZ sich als eine sinnvolle Therapieoption in der Behandlung von Krankheitsbildern bei Patienten mit einem hohen Risiko, an MRSA-induzierten Folgeinfektionen zu erkranken¹⁴².

1.2.5 Sirolimus (SRL)

SRL, ein makrozyklisches Laktone und natürliches Fermentationsprodukt von *Streptomyces hygroscopicus*, ist ein Immunsuppressivum, das bei Nieren-, Leber-, Bauchspeicheldrüsen- und Herztransplantationen eingesetzt wird, um akute Organabstoßungen zu vermeiden^{59, 145}. SRL ist ein schwer dosierbarer Arzneistoff, der eine Blutspiegelüberwachung im Rahmen des „Therapeutic Drug Monitoring“ (TDM) erforderlich macht, um die arzneistoffbedingte Toxizität zu minimieren und die Therapieeffektivität zu optimieren^{58, 59}. Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass ein TDM von SRL aufgrund von zwei wichtigen Gründen angebracht ist: I) eine Korrelation zwischen der Talspiegelkonzentration und der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, II) eine Korrelation der SRL-Toxizität in Abhängigkeit von SRL-Talspiegelkonzentrationen > 15 µg/L^{146, 147}.

SRL ist zum überwiegenden Teil an Blutbestandteile, speziell Erythrozyten, assoziiert und weist ein stark variierendes Vollblut/Plasma-Verhältnis mit einem Durchschnittswert von 36/1 auf^{145, 148, 149}. Im Blut verteilt sich SRL in Erythrozyten (94,5 %), Plasma (3,1 %), Lymphozyten (1,01 %) und Granulozyten (1,0 %)¹⁵⁰. Zusätzlich weist SRL eine PPB von

> 90 % auf^{150, 151}. In Anbetracht dieser Fakten ist die ‚freie‘, nicht an Matrixbestandteile gebundene SRL-Plasmakonzentration oft unterhalb des Messbereiches von routinemäßig eingesetzten Analysentechniken¹⁵².

2 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Fragestellung nachgegangen werden, welchen Einfluss die klinisch relevanten Antibiotika Levofloxacin (LVX), Daptomycin (DPT) und Clindamycin (CLI) auf spezifische Zellfunktionen von humanen polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) besitzen. Da in der Arzneistofftherapie allgemein angenommen wird, dass häufig nur die ‚freie‘, nicht an Blutbestandteile gebundene Arzneistofffraktion pharmakologisch wirksam ist und für die Elimination zur Verfügung steht, sollte darüber hinaus die Anwendbarkeit der Festphasenmikroextraktion (SPME) zur Bestimmung der ‚freien‘ Arzneistoffkonzentration aus bioanalytisch bedeutsamen Matrices evaluiert werden.

Folgende Fragestellungen waren dabei von besonderem Interesse:

1. Einfluss ausgewählter Antibiotika auf spezifische Funktionen der PMN

Kommt es zu einer intrazellulären Aufnahme bzw. Akkumulation von LVX, DPT und CLI in PMN? Welchen Einfluss haben diese Antibiotika auf die spezifischen Zellfunktionen Viabilität, Chemotaxis, Phagozytose, „Oxidative Burst“ und die Sekretion von Interleukinen? Besteht eine Korrelation zwischen den zellassoziierten Arzneistoffkonzentrationen und den auftretenden Einflüssen auf spezifische PMN-Funktionen?

2. Bestimmung von ‚freien‘ Arzneistoffkonzentrationen mittels SPME

Ist die SPME geeignet, um die ‚freie‘ Arzneistofffraktion von Arzneistoffen mit einem engen therapeutischen Fenster (am Beispiel von Sirolimus (SRL)) und somit einem hohen Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkungen beziehungsweise Therapieversagen zu bestimmen? Ist die SPME geeignet, die ‚freie‘ Arzneistoffkonzentration von Arzneistoffen mit hohen (DPT) und niedrigen (LVX) PPB zu bestimmen? Besitzt die SPME das Potential zur Bestimmung von therapeutisch relevanten Arzneistoffkonzentrationen verschiedener Arzneistoffe (SRL, LVX, DPT und LNZ)? Eignet sich die SPME zur indirekten Bestimmung der Arzneistoffbindung an Matrixbestandteile und stellt sie somit eine Alternative zu konventionellen Methoden wie der Ultrafiltration dar?

3 Material und Methoden

3.1 Substanzen

DPT (Cubicin[®]) wurde von Novartis Pharma GmbH (Nürnberg, Deutschland) und Ethylparaben (IS für Daptomycin-Analytik) von Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz) bezogen. LVX und Moxifloxacin (IS) wurden von Bayer Healthcare (Leverkusen, Deutschland), Clindamycin-2-hydrogenphosphat (Clinda-saar[®]) und Pirlimycin (Pirsue[™], IS) von MIP Pharma GmbH (Blieskastel, Deutschland) bzw. Pfizer Ltd. (Sandwich, Kent, Großbritannien) käuflich erworben. SRL und 32-Desmethoxyrapamycin (IS für Sirolimus-Analytik, DMR) wurden bei Pfizer Ltd. (New York, USA), LNZ bei Pharmacia GmbH (Karlsruhe, Deutschland) geordert. Mit Polyacrylnitril-C18 (PANC18) beschichtete SPME-Blades wurden freundlicherweise von Supelco Deutschland GmbH (Oberhaching, Deutschland) und PAS Technology (Magdala, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

D-PBS, 0,4 % Trypanblau-Lösung und fluoreszenzmarkierte *Escherichia coli* (FITC-*E.coli*) stammen von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland). Dextransulfat, Histopaque[®] 1077, Propidiumiodid, Dihydrorhodamin 123, *E.coli*, N-Formyl-methionin-leucin-phenylalanin (fMLP), 13-Phorbol-12-myristatacetat (PMA) und das Immersionsöl Nikon[®] wurden bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) gekauft. Ammoniumchlorid wurde von Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland) und Biseko[®] von Biotest Pharma GmbH (Dreieich, Deutschland) bezogen. FACS[™] Lyselösung wurde von BD Bioscience (San Jose, USA) käuflich erworben. Methylenblau stammt von den Farbwerken Hoechst AG (Frankfurt/Main, Deutschland). Ameisensäure z.A. und alle Lösungsmittel (HPLC Grade) wurden bei Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) gekauft.

Zymosan-aktiviertes Meerschweinchenserum wurde vom Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der Universität Rostock zur Verfügung gestellt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Humanes Vollblut sowie Heparin- und EDTA-antikoaguliertes Plasma wurde gesunden Spendern (18-44 Jahre, Nichtraucher, keine medikamentöse Behandlung mindestens 4 Wochen vor der Spende), die nach ärztlicher Aufklärung schriftlich ihr Einverständnis über die Spende abgelegt haben, entnommen.

Das Plasma wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert, während Vollblut umgehend für die Gewinnung von humanen PMN bzw. für die Extraktionsstudien mit SPME-Sonden verwendet wurde. Entsprechende Stellungnahmen (A 2011 69, A 2011 112) durch die Ethikkommission an der Universitätsmedizin der Universität Rostock wurden eingeholt.

3.2 Geräte

Die Viabilität der PMN nach Inkubation mit Antibiotika wurde unter Verwendung eines Bresser Mikroskopes von Meade Instruments Europe (Rhede, Deutschland) bestimmt. Änderungen im chemotaktischen Verhalten der PMN wurden mittels eines Labophot 2 Mikroskopes von Nikon® (Tokio, Japan) in Kombination mit einer Kamera und einer Kontrolleinheit C2400 von Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH (Herrsching am Ammersee, Deutschland) gemessen. Die Daten wurden mit der Chemotaxis® Software Version 3.0 von HaSoTec (Rostock, Deutschland) aufgenommen und verarbeitet. Die Phagozytoseaktivität und der „Oxidative Burst“ der PMN wurden an einem Durchflusszytometer von BD Biosciences (San Jose, USA) mit der Software BD CellQuest™ Pro ermittelt. Die Freisetzung von Zytokinen wurde unter Verwendung eines Anthos HTIII Instrumentes mit der Software Winread 2.3 (Anthos Labtec, Salzburg, Österreich) bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz: 595 nm) bestimmt. Die quantitativen Bestimmungen der Arzneistoffkonzentrationen in Zellen oder Inkubationsmedien wurden flüssigchromatographisch durchgeführt, wobei HPLC-Anlagen von Shimadzu (Kyoto, Japan), jeweils bestehend aus einem Degasser, Säulenofen, Autoinjektor, zwei Pumpen, einer Probenkühleinheit, einem UV- bzw. Fluoreszenz-Detektor, zum Einsatz kamen. Die Daten wurden mit der Herstellersoftware LC Solution® Version 1.22 aufgenommen und verarbeitet. Im Fall von DPT und SRL wurde die Detektion zusätzlich unter Verwendung des Tandemmassenspektrometers TSQ7000 von Thermo (Dreieich, Deutschland) erreicht.

3.3 Untersuchungen zum Einfluss ausgewählter Antibiotika auf spezifische PMN-Funktionen

3.3.1 Isolierung von PMN aus humanem Vollblut

Zwei von einander unterschiedliche Prozeduren zur Gewinnung von PMN aus humanem Vollblut wurden verwendet, um in der Literatur diskutierte Fehlerquellen wie falsch-positive Ergebnisse für die Phagozytoseaktivität und den „Oxidative Burst“ von PMN zu vermeiden¹⁵³⁻¹⁵⁶.

Für die Bestimmung der intrazellulären Aufnahme von Antibiotika in PMN sowie der Beeinflussung der Viabilität und der Freisetzung von Zytokinen durch LVX, DPT und CLI wurden die PMN unter Verwendung einer dreistufigen Zellisolierungsprozedur aus humanem Vollblut gewonnen. Zunächst wurden 7 mL Vollblut mit dem Volumenäquivalent einer 1 % Dextransulfat/PBS-Lösung vermischt und bei 37°C für 50 min gelagert, wodurch eine Sedimentation der Erythrozyten erreicht werden konnte. Anschließend wurde die Erythrozyten-arme Phase mit Histopaque® 1077 unterschichtet (1/1 (v/v)) und 30 min bei 9800x g zentrifugiert, um die Monozyten von den PMN abzutrennen. Durch Aufnahme der erhaltenen Zellpellets in 4 mL 0,9 % Ammoniumchlorid/H₂O und einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C konnte die Lyse der verbliebenen Erythrozyten erzielt werden. Im Anschluss wurde das Gemisch zweimal mit 5 mL PBS gewaschen und für 5 min bei 3700x g zentrifugiert. Die resultierenden Zellpellets wurden wieder in 3 mL 10 % Biseko®/PBS aufgenommen und auf eine Zellzahl von $3 \cdot 10^6$ PMN/mL eingestellt¹⁵⁷⁻¹⁶⁰.

Für die Bestimmung des Wanderungsverhaltens, der Phagozytoseaktivität der PMN und des „Oxidative Bursts“ durch die PMN wurde ein zweifacher Histopaque® 1077 Gradient verwendet. Nachdem das humane Vollblut mit einem Volumenäquivalent an Histopaque® 1077 unterschichtet und für 50 min bei 37°C inkubiert wurde, wurde die obere Schicht (Erythrozyten-arme Phase) abgetrennt und erneut mit Histopaque® 1077 (1/1 (v/v)) unterschichtet. Die erhaltenen Proben wurden für 30 min bei 9800x g zentrifugiert und für die Chemotaxis-Messungen mit 4 mL 0,9 % Ammoniumchlorid/H₂O für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 3700x g) wurden die Pellets zweimal mit 5 mL PBS gewaschen und die Zellzahl durch Auflösen der Pellets in frischem Heparin-

Plasma des Spenders (Phagozytose, „Oxidative Burst“) bzw. in 10 % Biseko®/PBS (Chemotaxis) auf $3 \cdot 10^6$ PMN/mL eingestellt. Alle Zellisolierungen wurden durch Differentialblutbilder auf eine Reinheit an PMN von über 95 % überprüft.

3.3.2 Eingesetzte Antibiotika-Konzentrationen in den Zellstudien

Die finalen Konzentrationen an LVX, DPT und CLI in PMN-haltigen Lösungen wurden so gewählt, dass sie den niedrigen ($0,5 \times C_{\max}$), den mittleren (C_{\max}) und den hohen ($2 \times C_{\max}$) therapeutischen Konzentrationsbereich widerspiegeln. Für LVX betragen diese Konzentrationen nach Gabe von 500 mg LVX/Tag¹³¹ somit 2,5, 5,0 und 10,0 mg/L. Für DPT und CLI ergaben sich 30, 60 und 120 mg/L (Gabe von 4 mg DPT/kg Körpergewicht/Tag¹²⁴) bzw. 1,75, 3,50 und 7,00 mg/L (4×300 mg CLI/Tag).

3.3.3 Bestimmung der zellassozierten Arzneistoffkonzentrationen

Die Bestimmungen der zellassozierten, das heißt intrazellulären und an Zellmembranen gebundenen, Arzneistoffkonzentrationen wurden unter Verwendung von vollständig nach internationalen Richtlinien¹⁶¹⁻¹⁶³ validierten HPLC-Methoden durchgeführt.

Für jedes der drei Antibiotika mit den Konzentrationen von $0,5 - 2 \times C_{\max}$ wurde zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (5 – 180 min, 37°C) eine Probe von 0,5 mL aus der Arzneistoff-haltigen Lösung entnommen und für 5 min bei 4°C und 3700x g zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde zweimal mit 0,5 mL eiskalter PBS gewaschen und bis zur Analyse mittels HPLC bei -80°C gelagert. Um die zellassozierten Konzentrationen zu bestimmen, wurden die Zellpellets mit 50 µL H₂O behandelt und mit 50 µL IS versetzt. Nach der Zugabe von 190 µL Acetonitril wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 20°C, 7000x g), der Überstand abgenommen und unter einem leichten Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 50 µL des entsprechenden LC-Starteluenten aufgelöst und 20 µL davon ins HPLC-System zur Analyse injiziert.

3.3.4 Berechnung der zellassozierten Arzneistoffkonzentration

Die zellassozierte Anreicherung von LVX, DPT und CLI in humanen PMN wurde mathematisch in Anlehnung an Schüler et al.⁴⁸ ermittelt (Gleichung 3). Dabei wurden folgende Grundannahmen berücksichtigt: Das intrazelluläre Volumen von einem PMN beträgt $0,27 \cdot 10^{-12}$ L und PMN besitzen einen inneren Durchmesser von 8 µm sowie eine ausgeprägte Kugelform⁴⁹. Das von Taira et al.⁴⁹ berechnete zellassozierte PMN-Volumen ist vergleichbar mit anderen Angaben in der Fachliteratur, die in einem Bereich von $0,22 \cdot 10^{-12} - 0,31 \cdot 10^{-12}$ L liegen^{48, 164, 165}.

$$C_{\text{zellassoziert}} = f \cdot C_{\text{AB, Lsg}}$$

$$f = (V_{\text{Lsg}} + V_{\text{PMN, gesamt}}) / V_{\text{PMN, gesamt}}$$

$$V_{\text{PMN, gesamt}} = V_{\text{PMN}} \cdot N_{\text{PMN}}$$

Gleichung 3: Berechnung der zellassozierten Arzneistoffkonzentrationen⁴⁸.

mit folgenden Abkürzungsbedeutungen:

f	- Verdünnungsfaktor
C _{AB, Lsg}	- Konzentration des Arzneistoffes in der finalen Lösung
V _{Lsg}	- Volumen der finalen Lösung
V _{PMN, gesamt}	- intrazelluläre Volumen von $1,5 \cdot 10^6$ PMN
V _{PMN}	- Volumen von einem PMN
N _{PMN}	- Zahl der verwendeten PMN

3.3.5 Zellviabilität

Die Viabilität der PMN nach Inkubation mit den drei Antibiotika wurde stündlich über einen Zeitraum von 17 h unter Verwendung eines Farbausschluss-Assays ermittelt. Die PMN wurden mit $0,5 - 2 \times C_{\text{max}}$ von LVX, DPT und CLI in 10 % Biseko[®]/PBS inkubiert. Stündlich wurden 50 µL der Antibiotika-haltigen PMN-Lösungen mit 50 µL PBS sowie 100 µL einer 0,4 % Trypanblau-Lösung behandelt und die lebenden und toten Zellen mikroskopisch ausgezählt. Die Überlebensrate der PMN unter Antibiotika-Inkubation wurde anschließend auf identische, aber arzneistofffreie Proben (Kontrollen) normiert.

3.3.6 Chemotaxis

Der Einfluss von Antibiotika auf das Wanderungsverhalten von PMN wurde für LVX, DPT und CLI unter Verwendung des Konzentrationsniveaus $2 \times C_{\max}$ in 10 % Biseko®/PBS untersucht. Dabei wurden modifizierte Boyden-Kammern mit Zellulosenitratfiltern (3 µm Porengröße) und sowohl fMLP (1 µg/L in 10 % Biseko®/PBS) als auch Zymosan-aktiviertes Meerschweinchenserum (ZAS, 1 g/L in 10 % Biseko®/PBS¹⁶⁶) als Chemoattraktanten verwendet. Nachdem die PMN mit LVX, DPT bzw. CLI für 1, 3 und 5 h bei 37°C inkubiert worden sind, wurden die Lösungen mit 10 % Biseko®/PBS auf eine finale Zellzahl von 1×10^6 PMN/mL verdünnt. In den unteren Teil der Kammern wurden 450 µL des Chemoattraktants und in den oberen Teil 450 µL der PMN-haltigen Lösung gegeben. Die präparierten Boyden-Kammern wurden anschließend für 3 h bei 37°C in einer feuchten Umgebung gelagert. Danach wurden die Zellen im Filter für 3 min in 50 % Ethanol/H₂O fixiert, die Filter 8 min in einer 1 % alkoholischen Methylenblau-Lösung eingefärbt und mit destilliertem H₂O gespült. Im Anschluss wurden die Filter über Nacht getrocknet und vor der mikroskopischen Auszählung mit einem Tropfen Immersionsöl behandelt. Die Filter wurden mikroskopisch analysiert, indem die Zellzahlen der einzelnen Filterschichten in 10 µm Schritten durch den Filter, beginnend von der Filteroberfläche hin zu den distalen Schichten, ausgezählt wurden (Bestimmung der Lokomotion-Indizes LI). Analog wurden sowohl arzneistofffreie Proben als auch Proben ohne Chemoattraktanten hergestellt, um den Einfluss der Antibiotika auf das Wanderungsverhalten der PMN in Richtung einer fMLP- bzw. ZAS-haltigen Quelle zu bestimmen. Der Migrationsindex (MI) der PMN nach Inkubation mit einem Antibiotikum wurde wie folgt berechnet (Gleichung 4):

$$LI = \sum (PMN/S * D) / \sum PMN$$

$$CI = LI_+ / LI_-$$

$$MI [\%] = CI_{AB+} / CI_{AB-} * 100$$

Gleichung 4: Berechnung der Migrationsindizes der PMN nach Inkubation mit den Antibiotika.

mit folgenden Abkürzungsbedeutungen:

PMN/S - Zellen pro Schichttiefe des Filters

D - Distanz der Zellen von der Filteroberfläche

LI₊ - Lokomotion-Index der PMN in Richtung des Chemoattraktantes

LI - Lokomotion-Index der PMN in Richtung eines Kontrollmediums

CI_{AB+} - Chemotaktischer Index der PMN nach Arzneistoff-Inkubation

CI_{AB-} - Chemotaktischer Index der PMN in arzneistofffreien Kontrolllösungen

MI - Migrationsindex der PMN nach Inkubation mit einem Antibiotikum, normiert auf arzneistofffreie Kontrolllösungen

3.3.7 Phagozytose und „Oxidative Burst“

Änderungen in der Phagozytoseaktivität der PMN gegenüber FITC-*E.coli* und in der Freisetzung radikaler Sauerstoffspezies („Oxidative Burst“) durch die PMN nach Stimulation mit *E.coli*, fMLP bzw. PMA wurden mittels Durchflusszytometrie ermittelt¹⁵⁶. Dazu wurden PMN mit 0,5 -2x C_{max} an LVX, DPT und CLI bzw. mit 10 % Biseko®/PBS (Kontrolllösungen) inkubiert.

Zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität wurden 100 µL PMN-Lösung (~300 000 PMN) für 10 min bei 4°C auf Eis gelagert. Anschließend wurden 20 µL FITC-*E.coli* (10⁹ Bakterien/mL PBS) hinzugefügt und die Proben für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Lagerung der Proben auf Eis wurden diese zweimal mit 2 mL eiskalter PBS gewaschen und zentrifugiert (250x g, 5 min, 4°C). Nach der Zugabe von 1 mL Lyse-Lösung (BD-Lyse®/H₂O = 1/9 (v/v)) zum Rückstand wurden die Proben für 20 min bei 20°C im Dunkeln gelagert, erneut zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Der verbleibende Rückstand wurde in 200 µL 5 mg/L Propidiumiodid/PBS rekonstituiert und bis zur Messung auf Eis gelagert.

Für die Bestimmung des „Oxidative Bursts“ durch PMN wurden pro Antibiotikum und pro Konzentrationslevel 4 Proben hergestellt. Dazu wurden jeweils 100 µL PMN-Lösung für 10 min bei 4°C auf Eis gelagert. Zu der ersten Probe wurden 20 µL PBS, zur zweiten 20 µL *E.coli* (2*10⁹ Bakterien/mL PBS), zur dritten 20 µL 5 µmol/L fMLP und zur vierten 20 µL 8,1 µmol/L PMA gegeben. Nachdem die Proben für 10 min bei 37°C inkubiert

wurden, erfolgte die Zugabe von 20 μ L 35 μ mol/L Dihydrorhodamin 123/PBS. Die Proben wurden erneut für 10 min bei 37°C gelagert. Anschließend wurden die Proben mit 1 mL Lyse-Lösung versetzt, 20 min bei 20°C im Dunkeln gelagert, zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Der verbleibende Rückstand wurde in 200 μ L 5 mg/L Propidiumiodid/PBS rekonstituiert und bis zur Messung auf Eis gelagert.

3.3.8 Sekretion von Zytokinen

Änderungen in der Zytokinsekretion von LVX-, DPT- und CLI-inkubierten PMN wurden nach einer Inkubationszeit von 18 h bei 37°C mittels „Enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISA) bestimmt. Dazu wurden die PMN mit 0,5 - 2x C_{max} der Antibiotika in 10 % Biseko®/PBS inkubiert und anschließend die Proben für 15 min bei 9800x g zentrifugiert. Die Überstände wurden bis zur Messung bei -80°C tiefgefroren. Unter Verwendung der ELISA-Testkits von R&D Systems Europe (Abingdon, Großbritannien) wurde die Freisetzung folgender Zytokine untersucht: IL-1 β , -2, -6, -8, -10, -12 p70 und TNF- α . Dazu wurden 96-Well-Platten über Nacht mit den entsprechenden Capture-Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden jeweils die Proben und Standards hinzugegeben und für 90 min bei 20°C inkubiert. Die Zugabe eines Biotin-markierten Antikörpers und einer Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase wurde durch Spülschritte mit einer 1 % Tween 20/0,9 % Natriumchloridlösung ergänzt. Nach einer anschließenden Inkubation der 96-Well-Platten für 15 min mit Tetramethylbenzidin-Substrat wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge: 595 nm) gemessen und die Zytokin-Konzentrationen über Regressionsfunktionen der Kalibratoren berechnet.

3.4 SPME von Arzneistoffen

3.4.1 Herstellung von Polymer-beschichteten SPME-Sonden

Die Herstellung von SPME-Sonden, die mit PTh und PPy beschichtet waren, wurde im Institut für Chemie der Universität von Torun (Polen) durch elektrochemische Abscheidung der Polymere auf einem Trägermaterial erreicht^{98, 102}. SPME-Fasern mit einer Beschichtung aus Poly[3,4-ethyldioxythiophen] (PEDOT) wurden unter

Verwendung einer vergleichbaren Prozedur manuell hergestellt. Zur Herstellung der Sonden wurde ein Dreielektrodensystem bestehend aus einer Edelstahl (Nickel/Chrom)-Arbeitselektrode ($\varnothing = 750 \mu\text{m}$, $l = 10 \text{ cm}$), einer Platinnetz-Gegenelektrode und einer Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode verwendet. Als Grundelektrolyten wurden Lösungen von 0,1 mol/L Tetrabutylammonium tetrafluorborat bzw. Tetrabutylammonium perchlorat in Acetonitril eingesetzt. Die Beschichtungslängen der Fasern betrugen zwischen 1,8 und 2,2 cm. Die präparierten SPME-Sonden wurden mittels „Scanning Electron Microscopy“ (SEM) hinsichtlich ihrer Homogenität und Partikelgröße charakterisiert.

3.4.2 Präkonditionierung der SPME-Sonden

Bevor die SPME-Sonden für die Extraktionsstudien genutzt wurden, erfolgte eine Präkonditionierung der Fasern, um diese von Produktionsrückständen zu befreien und an die Art der Adsorptions- und Desorptionsmedien (wässrig, methanolisch) zu adaptieren. Dazu wurden die SPME-Sonden für 2 h bei 20°C in $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 9/1$ (v/v) gelagert. Anschließend wurden die Fasern drei Adsorptions-Desorptions-Zyklen, bestehend aus einer 10 minütigen Adsorption in H_2O und einer ebenso langen Desorption in CH_3OH (37°C, 400 rpm, Thermoshaker), unterzogen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die SPME-Sonden bei 20°C in $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 9/1$ (v/v) gelagert.

3.4.3 SPME von Antibiotika aus verschiedenen Adsorptionslösungen

Die SPME von DPT und LVX wurden aus Adsorptionslösungen mit variierten Proteingehalten (PBS, 10, 15, 20 % Biseko®/PBS, Heparin-Plasma) durchgeführt, wobei Konzentrationen eingesetzt wurden, die den $0,5 - 2 \times C_{\text{max}}$ – Bereich widerspiegeln. Die eingesetzten SPME-Sonden waren mit PPy, PTh, PEDOT und PAN-C18 beschichtet. Zur Steigerung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden die einzelnen Sonden hinsichtlich ihres $m_{\text{Polymer}}/l_{\text{Polymer}}$ -Quotienten in einzelne Gruppen unterteilt.

Ausgehend von folgenden, willkürlich definierten Standardbedingungen zur Durchführung der SPME-Experimente wurden systematische Untersuchungen zum Einfluss wichtiger Versuchsparameter auf die Extraktionsausbeuten der Fasern durchgeführt, wobei stets

ein Parameter variiert und die anderen konstant gehalten wurden. Zu den untersuchten Parametern zählten dabei die Faserbeschaffenheit, Extraktionszeiten, Temperaturen, pH-Werte, Agitation, Blutantikoagulation sowie die Salzzusatzkonzentration. Soweit nicht im Folgenden anders angegeben, wurden als Standardbedingungen gewählt: die Adsorption und Desorption erfolgte jeweils für 60 min bei 37°C und 400 rpm (Thermoshaker). Während die 1,8 mL Adsorptionslösungen in ihrer Art variierten, wurden für die Desorption immer 1,8 mL CH₃OH verwendet (37°C, 400 rpm). Die Desorptionsproben wurden mit dem entsprechenden IS versetzt, zentrifugiert (4 min, 7000x g, 20°C), unter einem leichten Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, der Rückstand im entsprechenden LC-Eluent rekonstituiert und für die Messungen ins LC-System injiziert. Die Equilibrierung der Fasern zwischen den einzelnen Extraktionszyklen fand für 30 min in 1,8 mL H₂O (37°C, 400 rpm) statt.

3.4.3.1 Einfluss der Sondenbeschaffenheit, pH-Werte, Salzkonzentrationen und Blutantikoagulation auf die SPME-Ausbeuten

Der Einfluss von unterschiedlichen Massen (m) und Längen (l) des Beschichtungspolymers wurde für die SPME von LNZ aus PBS mittels PPy-beschichteten Fasern untersucht. Bei 20°C wurden die Sonden für 10 min in 1,5 mL LNZ/PBS (15,0 mg/L) adsorbiert und für 5 min in 1,5 mL CH₃OH desorbiert. Dabei wurden PPy-beschichtete Fasern, deren m_{PPy} 0,5 mg, 0,8 mg, 1,0 mg und 1,3 mg sowie deren l_{PPy} 1,3 cm, 1,4 cm und 1,5 cm betrugen, verwendet.

Analog wurden PPy-beschichtete Fasern behandelt, die zur Bestimmung des Einflusses von pH-Werten, Salzkonzentrationen und der Blutantikoagulation auf die SPME von 15,0 mg LNZ aus verschiedenen Plasmen eingesetzt wurden. Als Salzzusatz wurden Konzentrationen von 50 – 100 mmol/L und 1 – 2 mol/L an NaCl gewählt. Die pH-Werte wurden mittels 0,02 mol/L Phosphatpuffer bzw. 30 % Salzsäure auf physiologische pH-Werte (~7,4) eingestellt. Das humane Vollblut wurde entweder mittels EDTA, Heparin oder Natriumzitrat antikoaguliert und das Plasma daraus durch Zentrifugation gewonnen.

Der Einfluss von Heparin- und EDTA-antikoaguliertem Vollblut auf die SPME von 0,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 35,0 und 40,0 $\mu\text{g/L}$ SRL wurde unter Verwendung von PAN-C18-beschichteten Sonden untersucht. Für die Equilibrierung von SRL in Vollblut wurden die dotierten Adsorptionslösungen vor Verwendung für 30 min geschüttelt (RotoShake® Stufe 5,5, 22°C). Die Extraktionszeiten betrugen 90 min (Adsorption) bzw. 15 min (Desorption) bei 400 rpm und 25°C.

3.4.3.2 Einfluss von Extraktionszeiten und –temperaturen auf die SPME-Ausbeuten

Um den Einfluss der Adsorptionszeit auf die Extraktion von C_{max} an LVX (13,8 $\mu\text{mol/L}$) und DPT (37,0 $\mu\text{mol/L}$) aus PBS sowie von 0,11 $\mu\text{mol/L}$ SRL aus Heparin-antikoaguliertem Vollblut zu bestimmen, wurden PPy-, PTh-, PEDOT- und PAN-C18-beschichtete Fasern verwendet. Die Adsorptionszeiten für die SPME von LVX und DPT betrugen 5, 10, 20, 60 min (60 min Desorption) und von SRL 5, 10, 15 und 25 min (15 min Desorption). Für die Equilibrierung von SRL in Vollblut wurden die dotierten Adsorptionslösungen vor Verwendung für 30 min geschüttelt (RotoShake® Stufe 5,5, 22°C). Variationen in den Desorptionszeiten (5, 10, 20, 60 min) wurden für die SPME von C_{max} an DPT aus PBS durchgeführt.

Eine mögliche Beeinflussung der Extraktionsausbeuten durch Variationen in den Adsorptions- (25, 30, 37, 45°C) und Desorptionstemperaturen (30, 37, 40, 50, 60°C) wurde für C_{max} an DPT aus PBS mittels PPy-, PTh-, PEDOT- und PAN-C18-beschichteten Fasern untersucht.

3.4.3.3 Einfluss von Agitation der Adsorptionslösungen auf die SPME-Ausbeuten

Zur Bestimmung des Einflusses von unterschiedlichen Schüttlergeschwindigkeiten (0, 300, 400, 500 rpm) auf die Extraktionsausbeuten von C_{max} an DPT aus PBS wurden die vier Sondenbeschichtungen verwendet. Dabei erfolgte sowohl eine Variation der Schüttlergeschwindigkeiten für die Adsorption als auch für die Desorption.

Am Beispiel von drei C_{SRL} wurde die Abhängigkeit der SPME-Ausbeuten vom Bewegungsmodus (schütteln (400 rpm), rühren (250 rpm), fließend (HLM-Model, 100 mL/min, siehe Kapitel 3.4.4)) untersucht. Die eingesetzten C_{SRL} betrugen 25,0 $\mu\text{g/L}$,

50,0 µg/L und 100,0 µg/L in Heparin-antikoaguliertem Vollblut. Die verwendeten Fasern waren mit PTh beschichtet. Unter Verwendung des HLM-Models (siehe Kapitel 3.4.4) wurden für die Extraktion von LNZ (5,0; 15,0 mg/L), DPT (20,0; 60,0 mg/L) und SRL (25,0; 100,0 µg/L) aus Heparin-antikoaguliertem Vollblut mittels PPy- und PTh-beschichteten Fasern die Auswirkungen variiert Fließgeschwindigkeiten (50, 100, 250, 500 mL/min) auf die SPME-Ausbeuten untersucht.

3.4.4 SPME unter Verwendung des Herz-Lungen-Maschinen Models (HLM)

Das HLM-Model, welches von Schubert et al.¹⁰³ 2007 eingeführt worden ist, wurde im Aufbau modifiziert und mit zirkulierendem Heparin-antikoaguliertem Vollblut bei 20°C betrieben. Das HLM-Model bestand aus einer Zentrifugalpumpe, einem Blutreservoir, einem Flussmeter und mehreren Sideports, um die SPME-Sonden für die Extraktionsversuche einzuführen, Blut für externe Analysen zu entnehmen bzw. Standardlösungen der Arzneistoffe hinzuzufügen.

Für die SPME-Untersuchungen wurden die Arzneistoffe DPT, LNZ und SRL sowie unbenutzte und zuvor einmal benutzte PPy- und PTh-beschichtete SPME-Sonden eingesetzt. Die verwendeten Konzentrationen von DPT und LNZ betrugen dabei 0 – 60,0 mg/L bzw. 0 – 15,0 mg/L^{98, 102}. Die Adsorptionszeit im zirkulierenden Blutstrom (*online* Modus) war 5 min, die Desorption erfolgte anschließend für 10 min in 1,8 mL CH₃OH. Die Flussrate wurde auf 100 mL/min gesetzt, um physiologische Bedingungen zu simulieren. Variationen in den Flussraten von 50 – 500 mL/min wurden nur für ausgewählte Konzentrationen zugelassen, um eine mögliche Abhängigkeit der Extraktionsrate von der Fließgeschwindigkeit der Adsorptionslösung zu untersuchen. Zusätzlich wurden externe Extraktionsexperimente mit benutzten Fasern durchgeführt (*offline* Modus, 10 min Adsorption)^{98, 102}.

Für SRL wurden Konzentrationen von 0 – 300 µg/L gewählt und die Flussrate des Blutes betrug ebenfalls 100 mL/min. Da SRL hauptsächlich in Erythrozyten inkorporiert ist¹⁵⁰, wurde nach der Zugabe der SRL-Standardlösungen eine Wartezeit von 30 min bei einer Flussrate von 500 mL/min gewählt, um ein Verteilungsgleichgewicht zwischen dem freiem

und dem durch Erythrozyten aufgenommenen SLR zu erreichen. Die *online* Adsorptionszeiten betrugen 10 min, die im *offline* Modus 15 min. Nachdem die SPME-Sonden mit H₂O gespült wurden, erfolgte eine Desorption in 1,8 mL CH₃OH (15 min, 300 rpm, 25°C) mit anschließender Equilibrierung der Sonden für 15 min in H₂O. Die Desorptionsproben wurden mit 50 µL DMR (5 µg/L) versetzt, zentrifugiert (4 min, 7000x g, 20°C), unter einem leichten Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 25 µL LC-Eluent rekonstituiert. Anschließend wurden 10 µL der finalen Lösung in das LC-System injiziert und mittels LC-MS/MS analysiert.

3.4.5 SPME von SRL aus einer Patientenprobe

Die Analyse einer Patientenprobe wurde nach Genehmigung der an der Universitätsmedizin Rostock angegliederten Ethikkommission (A 2011 69, A 2011 112) durchgeführt. Dabei wurde Patientenblut verwendet, das im Rahmen von routinemäßigen Blutspiegelkontrollen entnommen wurde und zur Vernichtung freigegeben war. In der Patientenprobe wurden über ein externes Referenzmessverfahren 24 µg/L SRL in EDTA-antikoagulierem Vollblut bestimmt. Jeweils aus 1,8 mL Vollblut wurde mittels PTh-, PPy- und PAN-C18-beschichteten Fasern für 90 min SRL extrahiert und anschließend für 15 min in 1,8 mL CH₃OH desorbiert. Die Desorptionsproben wurden mit 50 µL DMR (5 µg/L) versetzt, zentrifugiert (4 min, 7000x g, 20°C), unter einem leichten Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 20 µL LC-Eluent rekonstituiert. Anschließend wurden 10 µL der finalen Lösung in das LC-System injiziert und mittels LC-MS/MS analysiert.

3.5 Berechnung der mittels SPME bestimmten PPB

Aus den erzielten SPM-Extraktionsausbeuten von 0,5 – 2x C_{max} an DPT oder LVX in PBS und proteinhaltigen Lösungen wurden die PPB über folgende Gleichung bestimmt (Gleichung 5):

$$\text{PPB [\%]} = (1 - C_{\text{AB, Lsg}} / C_{\text{AB, PBS}}) * 100$$

Gleichung 5: Berechnung der mittels SPME erhaltenen PPB.

mit folgenden Abkürzungsbedeutungen:

$C_{AB, Lsg}$ - Konzentration des Arzneistoffes in der proteinhaltigen Lösung

$C_{AB, PBS}$ - Konzentration des Arzneistoffes in PBS

3.6 Bestimmung der PPB mittels Ultrafiltration (UF)

Die PPB für die Antibiotika LVX, DPT und CLI wurde mittels UF unter Verwendung von 10 kDa Nanosep®-Filtereinheiten (Fa. Pall/Sigma-Aldrich, Deutschland) bestimmt. Dabei wurden von den Antibiotika folgende C eingesetzt: 1,0, 2,5, 5,0, 8,0, 10,0 und 12,0 mg/L an LVX, 20, 29, 43, 58, 80, 100, 110, 120, 130 und 140 mg/L an DPT und 1,75, 3,50, 5,00, 7,00, 9,00 und 12,00 mg/L an CLI. Als Matrices wurden PBS, 10 %, 15 % und 20 % Biseko/PBS, Heparin-Plasma und zuvor bereits ultrafiltriertes Heparin-Plasma verwendet. Jeweils 250 µL von der Stammlösung wurden für 5 min bei 37°C im Wasserbad geschüttelt, anschließend 100 µL davon bei -80°C weggefroren und 100 µL für die UF verwendet. Die UF erfolgte für 15 - 60 min bei 7000x g und 37°C. Die Aliquote der Filtrate und Stammlösungen wurden mit 300 µL CH₃OH und 50 µL IS versetzt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand bis zur Trockene eingeeengt und anschließend im entsprechenden LC-Eluenten resolubilisiert. Die Berechnung der PPB erfolgte unter Verwendung der folgenden Gleichung von Craig et al.⁹¹ (Gleichung 6):

$$PPB [\%] = ((C_{AB, SL} - C_{AB, Filtrat}) / C_{AB, SL}) * 100$$

Gleichung 6: Berechnung der mittels UF erhaltenen PPB⁹¹.

mit folgenden Abkürzungsbedeutungen:

$C_{AB, SL}$ - Konzentration des Arzneistoffes in der Stammlösung

$C_{AB, Filtrat}$ - Konzentration des Arzneistoffes im Ultrafiltrat

3.7 Aufarbeitung von arzneistoffhaltigen Proben

LVX-, DPT- und CLI-haltige Proben wurden mittels Proteinfällung, Zentrifugation und Einengung aufgearbeitet^{51, Kapitel 3.8.1}.

Vollblutproben, die SRL enthielten und mittels SPE konventionell aufgearbeitet werden sollten, wurden zunächst über Nacht bei -20°C gelagert, um die Erythrozyten zum Platzen zu bringen. Zu 1 mL Vollblut wurden dann 15 µL IS (1 mg/L DMR/CH₃OH) und 1 mL einer

wässrigen 1 mol/L Zinksulfatlösung gegeben und anschließend für 1 min vermischt. Einer Zugabe von 3 mL CH₃OH folgte das Schütteln der Probe für 5 min mit anschließender Zentrifugation (10500x g, 20°C, 10 min). Zum Überstand wurden 2,5 mL H₂O hinzugeführt und das Gemisch an SPE-Kartuschen (C18ec, 200 mg, Chromabond, Marcherey-Nagel, Düren, Deutschland), welche mit 3 mL CH₃OH und 4 mL H₂O konditioniert wurden, aufgereinigt. SRL wurde mit 1,4 mL Heptan/2-Propanol (1/1, v/v) von den SPE-Kartuschen extrahiert und die Lösung unter einem leichten Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Vor der Messung mittels LC-MS/MS wurden die Rückstände in 25 µL des LC-Eluenten rekonstruiert, wovon 10 µL in das LC-System injiziert wurden.

LNZ-haltige Plasmaproben wurden unter Verwendung von C2-Kartuschen (100 mg, Chromabond, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), die jeweils mit 2 mL Acetonitril und H₂O konditioniert wurden, aufgereinigt. Dann wurden die Kartuschen mit 120 µL Plasmaprobe beladen und mit 1 mL H₂O und 1 mL 5 % Acetonitril/H₂O gewaschen. Die Elution von LNZ erfolgte mit 500 µL CH₃OH. Anschließend wurde die Elutionslösung bei 40°C unter einem leichten Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 100 µL LC-Eluent rekonstituiert, wovon 20 µL in das LC-System injiziert wurden^{98, 102}.

3.8 Quantitative Bestimmung der Arzneistoffkonzentrationen

3.8.1 Entwicklung und Validierung von zwei HPLC-Methoden zur quantitativen Bestimmung von DPT mittels UV- oder massenspektrometrischer Detektion

3.8.1.1 Chromatographische Bedingungen

Die flüssigchromatographische Trennung wurde unter Verwendung entweder einer Nucleosil® C8 HD – Säule (150 mm x 2.1 mm i.d., 5 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) oder einer Luna® C8 – Säule (150 mm x 2.1 mm i.d., 5 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, Phenomenex, Aschaffenburg) durchgeführt. Die Säulen wurden durch Vorsäulen (8 mm x 3 mm i.d.) des gleichen Materials geschützt. Die mobile Phase, bestehend aus 34 % wässriges Acetonitril mit 0,08 % Ameisensäure, wurde isokratisch mit einer Flussrate von 0,300 mL/min gepumpt. Die Säulentemperatur betrug 50°C. Die Detektion von DPT und Ethylparaben, dem

internen Standard, erfolgte mittels UV-Detektion bei 219 nm und/oder mittels Massenspektrometrie.

Für die massenspektrometrische Detektion (MS) von DPT wurden folgende optimierte Parameter erzielt: die Elektrospray-Ionisierungsquelle wurde auf 4,5 kV gehalten, während die Gasflüsse für das *sheath* und *auxiliary* Gas (beides Stickstoff) 82 psi und 5 mL/min betrugen. Die Temperatur der Heizkapillare wurde auf 262°C gesetzt. Die massenspektrometrische Analyse von DPT wurde im *negative ion mode* unter Aufzeichnung der Fragmentationenspur $m/z = 809.0$ ($z=2$) durch *Selected Ion Monitoring* (SIM) in der *centroid*-Darstellung erzielt.

3.8.1.2 Probenvorbereitung

Aus Lösungen von 1,00 g/L DPT/Plasma wurden Arbeitslösungen von 6,7 – 100,0 mg/L DPT/Plasma hergestellt. Eine Stammlösung von 1,00 g/L Ethylparaben/CH₃OH wurde mit H₂O auf eine Arbeitslösung von 80,0 mg/L verdünnt. Dabei wurde Ethylparaben zum einen aus Gründen der Vergleichbarkeit zu bereits publizierten Analysenmethoden für DPT¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ und zum anderen aufgrund von fehlenden, hinsichtlich der physiochemischen Eigenschaften von DPT geeigneten Substanzen als interner Standard für die Analytik mittels UV-Detektion ausgewählt.

Zu 800 µL Plasma wurden 150 µL H₂O und 50 µL 80,0 mg/L Ethylparaben (finale Konzentration $C = 4,0$ mg/L) gegeben. Anschließend wurden 175 µL dieser Plasmaproben mit 325 µL CH₃OH vermischt und für 10 min bei 7000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetrennt und unter einem leichten Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 100 µL 35 % wässrigen Acetonitril rekonstituiert, von dem 20 µL für die LC-Analyse verwendet wurden.

Kalibratoren (1,0, 3,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0, 15,0 mg/L) und Kontrollen (1,0, 8,0, 15,0 mg/L) für die DPT-Analyse mittels UV-Detektion wurden in identischer Weise hergestellt, mit Ausnahme der Zugabe von 150 µL der geeigneten DPT-Arbeitslösung anstatt von H₂O. Die DPT-Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollen für die

massenspektrometrischen Analysen wurden um eine Dekade geringer gewählt (0,02 – 1,5 mg/L).

3.8.1.3 Kalibrierung und Validierung der HPLC-Methoden

Die Methoden wurden unter Berücksichtigung der Richtlinien der *US Food and Drug Administration* (FDA)¹⁶¹⁻¹⁶³ für die Kontrollen der UV- (1,0, 8,0, 15,0 mg/L DPT/Plasma) und MS-Detektion (0,1, 0,8, 1,5 mg/L DPT/Plasma) oder, wie im Falle der Linearitätsüberprüfung für die gewählten Konzentrationsbereiche, unter Verwendung aller Kalibratoren validiert.

Die Selektivität der Methoden hinsichtlich DPT und Ethylparaben wurde für Plasmen (Zitrat, EDTA, Heparin) von mindestens 5 verschiedenen Spendern untersucht. Dabei wurden sowohl Plasmen ohne DPT und Ethylparaben als auch mit den beiden Substanzen gemessen. Die Wiederfindungen der Methoden wurden über die Peakflächenverhältnisse von DPT-haltigen Plasmaproben zu wässrigen DPT-haltigen Proben der gleichen Konzentrationen berechnet (n=10). Die Linearität über den Konzentrationsbereich wurde mittels linearer Regressionsanalyse bestimmt. Die *intra diem* und *inter dies* Reproduzierbarkeiten (Variationskoeffizient, CV) und Richtigkeiten (relativer Fehler, RE) der Methoden wurden für die entsprechenden Kontrollen ermittelt (n=10). Die untere Bestimmungsgrenze (*lower limit of quantification*, LLOQ) wurde für $C_{\text{DPT}} \geq 0,5 \text{ mg/L}$ (UV) und $C_{\text{DPT}} \geq 0,01 \text{ mg/L}$ (MS) untersucht und musste sowohl ein Signal/Rausch-Verhältnis >3 als auch Werte für RE und CV von $< \pm 15\%$ aufweisen.

Die Lagerungsstabilität für DPT-haltige Kontrollen (UV) in humanem Plasma wurde bei drei verschiedenen Temperaturen (20°C, 4°C, -20°C) über einen Zeitraum von einem Monat untersucht. Die chemische Stabilität einer 5,0 mg/L DPT/35 % wässrigen Acetonitril-haltigen Probe, die im Autosampler der HPLC-Anlage bei 8°C gelagert wurde, wurde nach 2, 9, 16, 19 und 25 Tage ermittelt.

3.8.1.4 Messung von DPT-haltigen Blutproben von Patienten

Die Analyse von Patientenproben wurde nach Genehmigung der an der Universitätsmedizin Rostock angegliederten Ethikkommission (A 2011 69, A 2011 112) und der schriftlichen Zustimmung der Patientin durchgeführt.

Eine 76-jährige Frau mit einer schweren persistenten Erkrankung wurde mit geringem Erfolg mit Meropenem (13 Tage) und Tigezyklin (4 Tage) behandelt, bevor die Therapie mit 500 mg DPT (Cubicin®) einmal täglich intravenös (über 15 min, 2 Tage) fortgesetzt wurde. Zusätzlich verabreichte Medikamente waren Digitoxin, Paracetamol, Torasemid, Metoclopramid, Pantoprazol, Acetylsalicylsäure und Simvastatin.

Vollblutproben, die mit Lithium-Heparin antikoaguliert waren, wurden direkt (Spitzenspiegel), 4 h nach dem Ende der Infusion und unmittelbar vor der nächsten Gabe von DPT (Talspiegel) genommen. Die Vollblutproben wurden bei 2400x g für 5 min zentrifugiert und das gewonnene Plasma bei -20°C bis zur Probenaufarbeitung und -messung gelagert. Die Proben wurden entsprechend der entwickelten DPT-Messverfahren aufgearbeitet und vermessen.

3.8.2 Flüssigchromatographische Analyse von DPT, LVX, CLI, LNZ und SRL

Die flüssigchromatographische Analyse von DPT-haltigen Proben aus den PMN- und SPME-Experimenten wurde unter Verwendung einer Nucleosil® C₈ HD - Säule und UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 219 nm durchgeführt [Kapitel 3.8.1]. Die Retentionszeiten für DPT und den IS Ethylparaben betrugen 11,2 bzw. 4,9 min.

Die flüssigchromatographische Analyse von LVX-haltigen Proben wurde unter Verwendung einer mit einer Vorsäule geschützten 150 x 2,0 mm i.d. YMC Pro C₁₈ - Säule (5 µm Partikelgröße, 120 Å Porengröße) von YMC Europa GmbH (Dinslaken, Deutschland) durchgeführt. Die mobile Phase, bestehend aus den Komponenten A (CH₃OH/0,1 mol/L NH₄Ac/H₂O = 10/5/85 v/v/v) und B (CH₃OH/0,1 mol/L NH₄Ac/H₂O = 40/5/55 v/v/v), wurde als Gradient mit einer Flussrate von 0,250 mL/min gepumpt, beginnend mit 22 % B, 25 % B nach 1 min und 32 % B nach 2 min Laufzeit. Die Detektion

der Analyten erfolgte mittels Fluoreszenzdetektor bei den Wellenlängen 504/296 nm. Die Retentionszeiten für LVX und den IS Moxifloxacin ($C = 2 \text{ mg/L}$) betrugen 4,5 bzw. 12,5 min⁵¹.

Die flüssigchromatographische Analyse von CLI-haltigen Proben wurde unter Verwendung einer 125 x 2,1 mm i.d. LiChrospher® RP 18ec - Säule (5 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße), geschützt durch eine Vorsäule des gleichen Materials, von Marcherey-Nagel (Düren, Deutschland) durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 50°C und einer mit 0,300 mL/min als Gradient gepumpten mobilen Phase, welche aus den Komponenten A (Acetonitril/25 mmol/L H_3PO_4 (pH 2,5) = 15/85 (v/v)) und B (Acetonitril/25 mmol/L H_3PO_4 (pH 2,5) = 20/80 (v/v)) bestand. Innerhalb von 20 min Analysenlaufzeit wechselte die Zusammensetzung des Eluenten von 100 % A zu 0 % A. Die Analyten wurden mittels UV-Detektion bei den Wellenlängen 198 und 280 nm erfasst. Die Retentionszeiten für CLI und Pirlimycin ($C = 5 \text{ mg/L}$, IS) betrugen 11,3 bzw. 14,5 min.

Die flüssigchromatographische Analyse von LNZ-haltigen Proben wurde unter Verwendung einer 150 x 2,1 mm i.d. Zorbax® RX - C_8 - Säule (5 µm Partikelgröße, 120 Å Porengröße), geschützt durch eine Vorsäule des gleichen Materials, von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 25°C und einer mit 0,240 mL/min isokratisch gepumpten mobilen Phase, welche aus 20 % Acetonitril/ H_2O bestand. LNZ wurde mittels UV/Vis-Detektor bei einer Wellenlänge von 251 nm erfasst. Die Retentionszeit für LNZ betrug 5,4 min^{142, 171}.

Die flüssigchromatographische Analyse von SRL-haltigen Proben und DMR (IS, $C = 5 \text{ µg/L}$) wurde unter Verwendung einer 125 x 2,1 mm i.d. Nucleosil® C18 - Säule (3 µm Partikelgröße, 120 Å Porengröße), geschützt durch eine Vorsäule des gleichen Materials, von Marcherey-Nagel (Düren, Deutschland) durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 35°C und einer mit 0,250 mL/min isokratisch gepumpten mobilen Phase, welche aus 80 % $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ mit 0,02 % Ameisensäure und 5,0 mmol/L NH_4Ac bestand. Die Analyten wurden mittels MS/MS-Detektion erfasst. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte unter Verwendung einer Elektrospray-Ionisierungsquelle bei 4,8 kV, die

Gasströme des *sheath*- und *auxiliary*-Gases (beides Stickstoff) betrugen 90 psi bzw. 30 mL/min. Die Temperatur der Heizkapillare wurde auf 225°C gesetzt. Als Kollisionsgas wurde Argon 5.0 mit 3,2 mTorr gewählt. Im *positive ion mode* wurden die Massenübergänge m/z 930,8 \rightarrow 863,8 ($z = 1$) für SRL und m/z 900,9 \rightarrow 833,6 ($z = 1$) für DMR durch *multiple reaction monitoring* (MRM) in der *centroid*-Darstellung aufgezeichnet. Die Retentionszeiten für SRL und DMR betrugen 4,6 bzw. 4,9 min.

3.9 Statistische Auswertungen

Der Einfluss von LVX, DPT und CLI auf die spezifischen PMN-Funktionen Viabilität, Chemotaxis, Phagozytoseaktivität, oxidative Burst und die Sekretion von Zytokinen wurde im Vergleich zu identischen, aber arzneistofffreien Proben (Kontrollen) berechnet. Die ermittelten Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse der erzielten Daten wurde unter Verwendung des Statistikprogrammes SigmaPlot 12.3 durchgeführt. Nachdem die Daten auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) getestet wurden, erfolgte die statistische Auswertung durch den gepaarten t-Test, wobei Unterschiede in den Mittelwerten als signifikant interpretiert wurden, wenn $*p < 0,05$ erfüllt war. Obwohl für einige Zellfunktionen mathematisch hoch signifikante Unterschiede ($**p < 0,01$) ermittelt werden konnten, wurde in Betracht der geringen Versuchszahlen (n-Zahlen) auf eine Angabe als hoch signifikant verzichtet und die Daten nur als signifikant interpretiert. Für die SPME-Studien wurden ebenfalls die Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Methodenentwicklung und –validierung zur quantitativen Bestimmung von DPT

Zur Bestimmung von zellassozierten DPT-Konzentrationen und der Leistungsfähigkeit von SPME-Fasern hinsichtlich der Extraktion von DPT aus bioanalytisch relevanten Matrices wurden HPLC-Methoden entwickelt, die sowohl eine photometrische (UV) als auch massenspektrometrische (MS) Detektion von DPT ermöglichen sollten.

Plasmaproben, die DPT und den IS Ethylparaben enthielten, wurden einer einfachen und schnellen Probenaufarbeitung mittels Proteinfällung, Desolvatisation und Rekonstitution im Starteluenten der HPLC unterzogen. Die flüssigchromatographische Trennung von DPT und Ethylparaben an einer Nucleosil® C8 HD – Säule erfolgte mit Retentionszeiten (t_R) von 11,2 bzw. 4,9 min (Abb. 3).

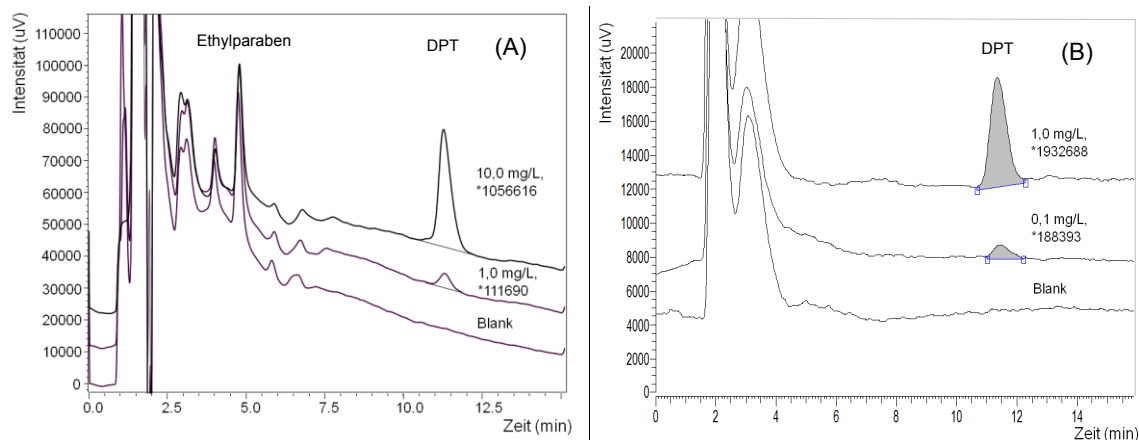


Abb. 3: Repräsentative LC-Chromatogramme einer undotierten (Blank) und zweier mit DPT dotierten Zitratplasma-Proben unter Verwendung einer Nucleosil® C8 HD - Säule: (A) UV-Detektion von 1,0 mg/L und 10,0 mg/L DPT ($t_R=11,2$ min) mit 4,0 mg/L Ethylparaben ($t_R=4,9$ min) bei 219 nm, (B) MS-Detektion von 0,1 mg/L und 1,0 mg/L DPT, Massenspur $m/z = 809,0$ ($z=2$).

Für analytische Aufgabenstellungen wie die flüssigchromatographische Trennung von komplexen Matrices, bei denen der Fokus primär auf der Selektivität einer Methode liegt, scheint die Nucleosil® C8 HD – Säule aufgrund der höheren DPT-Retentionszeit und der damit einhergehenden Trennung des DPT-Signals von matrixbedingten Störsignalen eine geeignete Alternative zu sein. Andererseits ermöglichte der Einsatz der Luna® C8 - Säule eine deutliche Reduzierung der Retentionszeiten von DPT und Ethylparaben auf 4,9 bzw. 4,3 min (Abb. 4), was insbesondere bei hohem Probenaufkommen von Interesse ist.

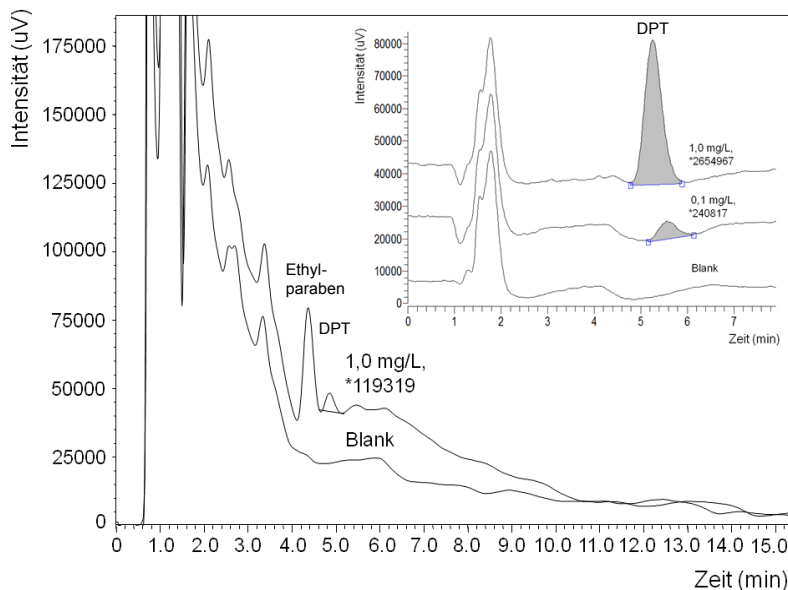


Abb. 4: Repräsentative LC-Chromatogramme einer undotierten (Blank) und einer mit DPT dotierten Zitratplasma Probe unter Verwendung einer Luna® C8 - Säule: UV-Detektion von 1,0 mg/L DPT ($t_R=4,9$ min) mit 4,0 mg/L Ethylparaben ($t_R=4,3$ min) bei 219 nm, *Einschub:* MS-Detektion von 0,1 mg/L und 1,0 mg/L DPT, Massenspur $m/z = 809,0$ ($z=2$).

Interferenzen aus der Matrix wurden nicht beobachtet, unabhängig davon ob das Blut mit Zitrat, EDTA oder Heparin antikoaguliert worden war. Da keine signifikanten Unterschiede in den Validierungsergebnissen in Abhängigkeit von den verwendeten Plasmaarten resultierten, werden im Folgenden die Ergebnisse für DPT in Zitratplasma erläutert.

Die Kalibrierfunktionen waren für beide Methoden über den gewählten Konzentrationsbereich (1,0 - 15,0 mg/L, UV), welcher sich an therapeutisch auftretende C_{DPT} orientierte, und für einen dazu um Faktor 10 erniedrigten Konzentrationsbereich für die MS-Detektion, linear ($r^2 > 0,99$). In Abbildung 5 sind exemplarisch die Kalibrierfunktionen für die Nucleosil® C8 HD – Säule, welche in den durchgeführten Zell- und SPME-Studien zur Quantifizierung von DPT eingesetzt wurde, sowohl für UV- als auch MS-Detektion dargestellt.

Die LLOQ für DPT unter Verwendung beider Säulen betrugen für die photometrische und für die massenspektrometrische Detektion jeweils 1,0 mg/L bzw. 0,02 mg/L. Die Gesamtwiederfindungen wurden für die LLOQ, mittlere und hohe Kontrolle bestimmt und betrugen 79 %, 102 % und 101 %.

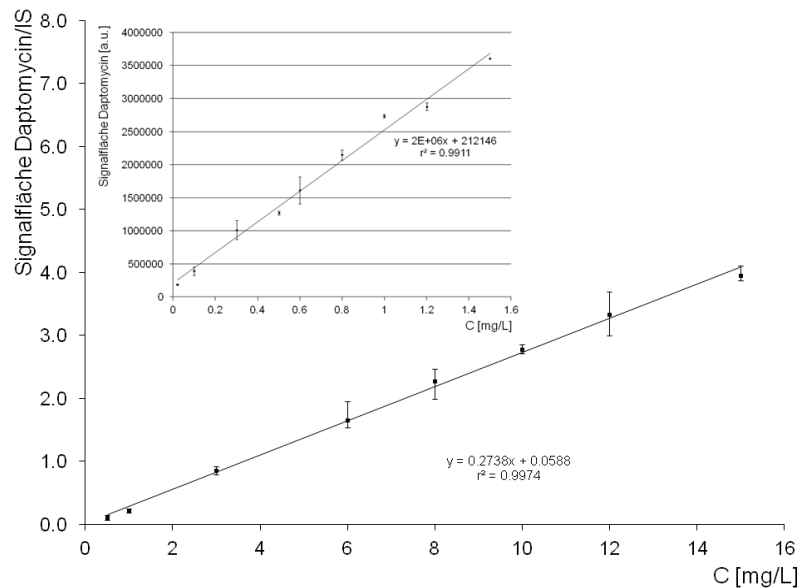


Abb. 5: Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von DPT aus humanem Zitratplasma unter Verwendung einer Luna® C8 – Säule mittels UV-Detektion (C = 0,5 - 15,0 mg/L) und MS-Detektion (C = 0,02-1,50 mg/L, *Einschub*), MW ± Bereich, n=3.

Die *intra diem* und *inter dies* Messpräzisionen (CV) und -richtigkeiten (RE) der Kontrollen wurde für alle Methoden ermittelt (Tab. 3) und lagen innerhalb der allgemein akzeptierten Toleranzbereiche¹⁶¹⁻¹⁶³.

Assay	C [mg/L]	<i>intra diem</i> (n=10)		<i>inter dies</i> (n=10)	
		CV [%]	RE [%]	CV [%]	RE [%]
Nucleosil® C8 HD (UV)	1,0	4,0	+12,2	4,9	+1,4
	8,0	4,1	+11,0	5,3	-5,1
	15,0	2,7	+11,4	4,6	-7,1
Nucleosil® C8 HD (MS)	0,1	13,4	+7,1	5,6	+3,4
	0,8	3,2	+3,4	4,9	+2,1
	1,5	8,6	-1,5	8,1	-4,5
Luna® C8 (UV)	1,0	2,1	-3,2	9,6	-4,9
	8,0	8,3	+4,2	6,7	+2,7
	15,0	7,4	-5,3	5,2	-6,1
Luna® C8 (MS)	0,1	1,8	-2,7	7,3	-3,4
	0,8	13,5	+3,5	4,9	-8,0
	1,5	2,3	-5,5	4,3	+1,1

Tab. 3: Die *intra diem* und *inter dies* Messpräzisionen (Variationskoeffizient, CV) und -richtigkeiten (relativer Fehler, RE) wurden für DPT-haltige Kontrollen in Zitratplasma, die den niedrigen, mittleren und hohen therapeutischen Konzentrationsbereich repräsentieren, berechnet.

Die chemische Stabilität von DPT in Plasma wurde über einen Zeitraum von einem Monat bei drei verschiedenen Temperaturen untersucht. Es zeigte sich, dass eine Lagerung bei -20°C zu keinen signifikanten Schwankungen in den C_{DPT} führte. Dem gegenüber resultierten für bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagerte Proben ein Substanzverlust von $\sim 20\%$ und bei $+20^{\circ}\text{C}$ kam es zu einem deutlichen Verlust an C_{DPT} um $\sim 90\%$ innerhalb von zwei Wochen. Für Langzeitlagerungen von DPT-haltigen Plasmaproben sind daher nur Temperaturen von $T \leq -20^{\circ}\text{C}$ geeignet. Ein Lagerungsversuch von DPT in 35% wässrigen Acetonitril bei $+8^{\circ}\text{C}$ zeigte keine Abnahme der C_{DPT} ($\text{CV} = 2,1\%$) über einen Zeitraum von einem Monat.

Die Analysen von Patientenproben, die während einer DPT-Therapie entnommen wurden, ergaben, dass keine chromatographischen Interferenzen (Koelution) durch die sieben zusätzlich verabreichten Medikamente auftraten. So wurde unter anderem für eine Probe, die vier Stunden nach der DPT-Infusion entnommen wurde, eine C_{DPT} von $6,5\text{ mg/L}$ ohne Interferenzen und mit hohen Reproduzierbarkeiten ($6,4 - 6,7\text{ mg/L}$, $n=4$) bestimmt.

4.2 Einfluss ausgewählter Arzneistoffe auf spezifische PMN-Funktionen

Zur Beurteilung des Einflusses von DPT, LVX und CLI auf spezifische PMN-Funktionen (Viabilität, Chemotaxis, Phagozytose, „Oxidative Burst“, Sekretion von Interleukinen) wurden die erhaltenen Ergebnisse auf arzneistofffreie Proben normiert. Auftretende Signifikanzen beziehen sich daher auf die Unterschiede zwischen arzneistoffhaltigen und -freien Proben.

Die Viabilitäten der PMN wurden durch DPT, LVX und CLI über einen Zeitraum von bis zu 17 h nicht beeinflusst und betrugen substanz- und konzentrationsunabhängig $98 - 102\%$. Spenderbedingte Unterschiede in den Zellviabilitäten waren gering ausgeprägt ($<1,3\%$). Die Gesamtzellzahl an PMN, das heißt die Summen aus intakten und geschädigten PMN in den Inkubationslösungen, nahm über den gleichen Zeitraum um $\sim 42\%$ ab (Abb. 6).

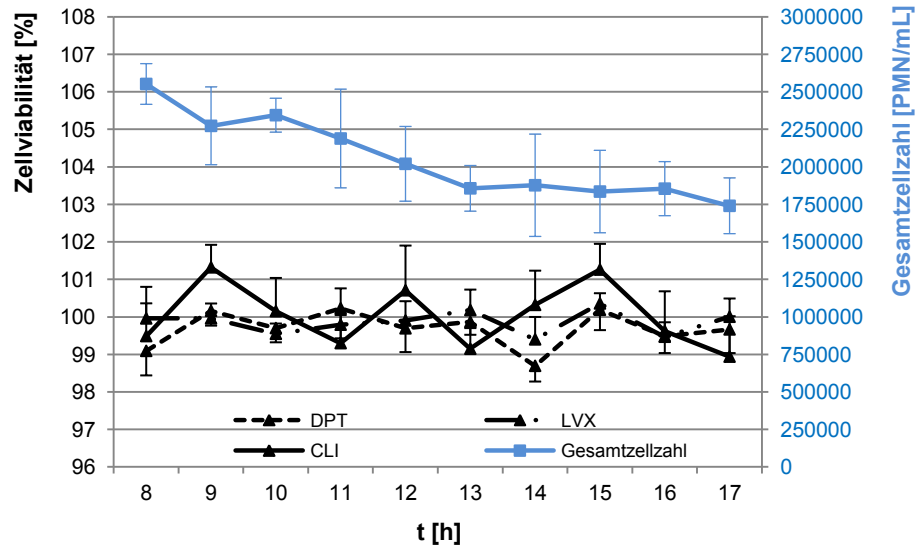


Abb. 6: Veränderung der PMN-Viabilität im Verlauf einer Inkubation mit C_{\max} von LVX (5,0 mg/L), DPT (60,0 mg/L) oder CLI (3,50 mg/L) sowie Veränderungen der Gesamtzellzahl an PMN (8 - 17 h), Angabe des MW \pm STABW, $n=7$.

Die zellassoziierte Anreicherung von LVX, das heißt die intrazelluläre Aufnahme in die PMN einschließlich einer eventuellen Anlagerung an die Zellmembran der PMN, erfolgte schnell in den ersten 5 min und erreichte nach 30 min eine „Steady State“-Konzentration. Während sich zwischen $0,5 \times C_{\max}$ und C_{\max} an LVX eine Konzentrationsabhängigkeit der zellassoziierten Anreicherung gegenüber der $C_{\text{extrazellulär}}$ von LVX andeutete, führte eine weitere Erhöhung der $C_{\text{extrazellulär}}$ nicht zu einer deutlichen Steigerung der zellassoziierten Akkumulation von LVX (Abb. 7).

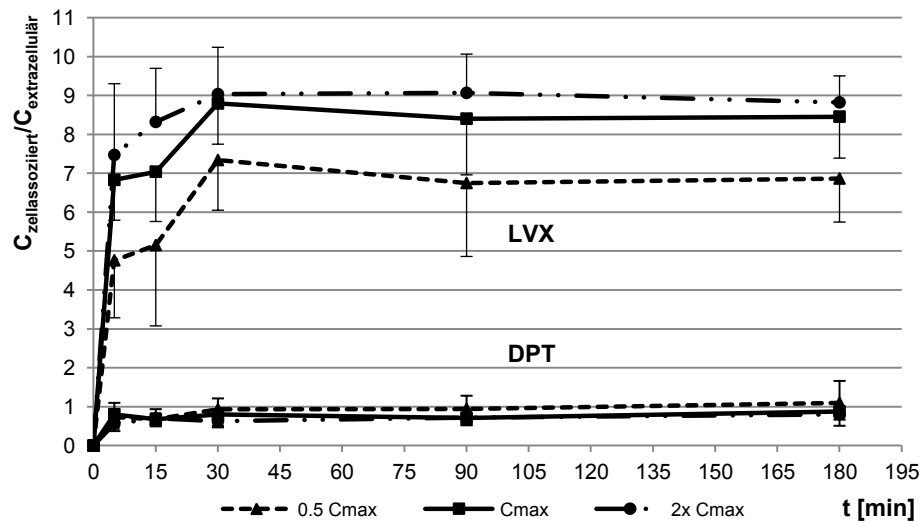


Abb. 7: Zellassoziierte Akkumulation von LVX und DPT in PMN für drei verschiedene extrazelluläre Konzentrationen, Angabe des MW \pm STABW, $n=7$.

Für DPT resultierten $C_{\text{zellassoziiert}}/C_{\text{extrazellulär}}$ -Verhältnisse von 0,5 – 1,1, wobei für DPT bereits nach 5 min eine „*Steady State*“ - Konzentration erreichte wurde. Die zellassoziierte Akkumulation für LVX betrug das 4–8-fache im Vergleich zu DPT, für welches keine signifikante Anreicherung in PMN stattfand. Im Fall von CLI konnten keine zellassoziierten Konzentrationen nachgewiesen werden.

Das chemotaktische Verhalten (Migrationsindex, MI) von PMN in Richtung einer fMLP-haltigen Quelle wurde durch LVX geringfügig supprimiert (-11 %) und durch DPT und CLI nicht signifikant beeinflusst. Das Wanderungsverhalten von PMN in Richtung einer mit Zymosan aktiviertem Meerschweinchenserum (ZAS) stimulierten Quelle wurde nach einstündiger Inkubation durch LVX (+19 %) und CLI (+27 %) signifikant erhöht (Abb. 8), während mit DPT inkubierte PMN nicht beeinflusst wurden. Nach 3 – bzw. 5 – stündiger PMN-Inkubation mit den drei Antibiotika war das Migrationsverhalten der PMN jeweils reduziert, die gemittelten MI lagen in einem Bereich von 85 – 92 %. Nach 5 h kam es durch alle drei Antibiotika zu einer signifikanten Abnahme im Wanderungsverhalten der PMN.

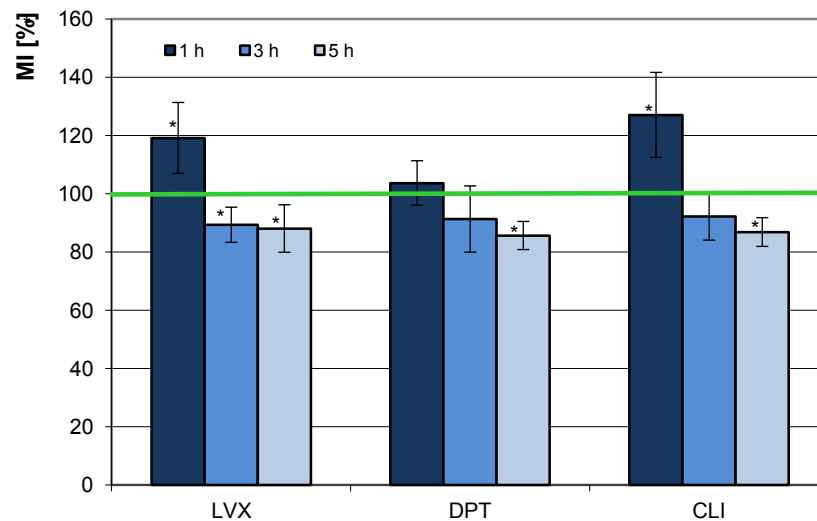


Abb. 8: Einfluss von $2 \times C_{\text{max}}$ an LVX (10,0 mg/L), DPT (120,0 mg/L) und CLI (7,00 mg/L) auf das Wanderungsverhalten (Migrationsindex, MI) von PMN in Richtung einer ZAS-haltigen Quelle, MW \pm STABW, n=7.

Die Phagozytoseaktivität (Phagozytoseindex, PI) von PMN gegenüber FITC-*E.coli* wurde durch LVX, DPT und CLI reduziert, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Antibiotika-Konzentrationspiegeln ($0,5 - 2 \times C_{\max}$) festgestellt werden konnten. Die Inhibierung des PI betrug durch LVX und CLI bis zu -52 %, durch DPT resultierte eine Herabsetzung der PI um bis zu -72 % (Abb. 9). Die größten Abnahmen in der PI ergaben sich dabei jeweils für C_{\max} nach 2 h. Für C_{\max} und $2 \times C_{\max}$ kam es für die ersten beiden Stunden zu einer signifikanten, zeitabhängigen Reduktion der PI, gefolgt von einer dazu gesteigerten Phagozytoseaktivität nach 3 h, die aber im Vergleich zu Kontrolllösungen ebenfalls signifikant erniedrigt war.

Die PI-Werte wiesen deutliche Variationen (11 – 25 % Unterschied) in Abhängigkeit von den einzelnen Blutspendern aus, jedoch weniger bei mehreren tagesverschiedenen Spenden ($n=4$; 4 – 19 %) von einer Person.

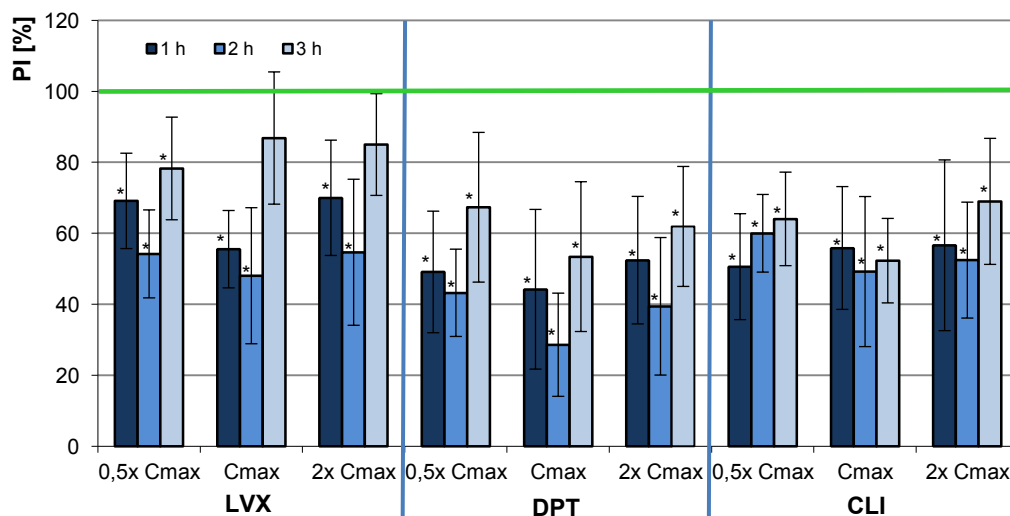


Abb. 9: Einfluss von drei verschiedenen Konzentrationen an LVX, DPT und CLI auf die Phagozytoseaktivität (Phagozytoseindex, PI) humaner PMN gegenüber FITC-*E.coli*, MW \pm STABW, $n=7$.

Die Freisetzung anionischer und radikalischer Sauerstoffspezies („Oxidative Burst“-Index, BI) durch PMN, die mit *E.coli* oder fMLP stimuliert worden sind, wurde durch die Antibiotika LVX, DPT und CLI kaum beeinflusst. Die gemittelten BI betrugen 84 - 106 %. Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses der drei Antibiotika auf die BI von PMA-stimulierten PMN (Abb. 10) resultierten in Verminderungen der BI durch LVX um bis zu -21 % sowie für DPT und CLI um bis zu -38%.

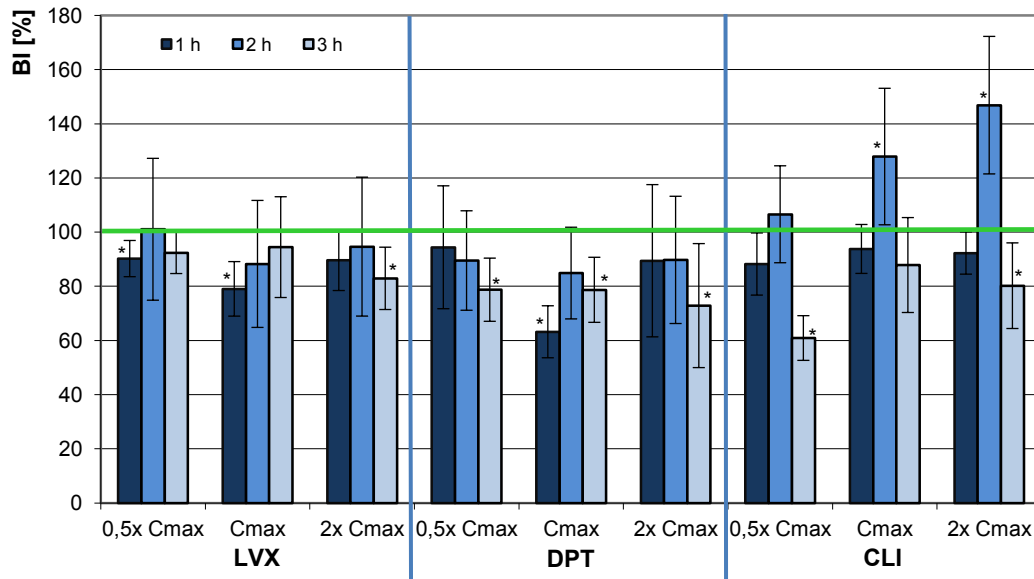


Abb. 10: Einfluss von drei verschiedenen Konzentrationen an LVX, DPT und CLI auf die Freisetzung anionischer und radikalischer Sauerstoffspezies („Oxidative Burst“-Index, BI) durch humane PMN, nachdem diese mit PMA stimuliert wurden, MW \pm STABW, n=9.

Nach 2 und 3 h kam es für mit CLI inkubierte und mit PMA stimulierte PMN zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Stimulation der BI (+47 %), wobei mit steigender Konzentration an CLI die Freisetzung von Sauerstoffspezies durch die PMN zunahm.

LVX-, DPT- und CLI-bedingte Einflüsse auf die Zytokinfreisetzung von PMN zeigten sich für die Interleukine IL-1 β , IL-6 und IL-8. Die Sekretionen von IL-2, -10, -12 p70 und TNF- α wurden durch die drei Antibiotika nicht beeinflusst.

PMN, die mit LVX inkubiert wurden, wiesen eine konzentrationsunabhängige Reduktion der Freisetzung von IL-1 β , IL-6 und IL-8 um bis zu -20 % auf (Abb. 11). Mit DPT inkubierte PMN zeigten eine drastische Reduktion der Freisetzung von IL-1 β (-63 %), IL-6 (-70 %) und IL-8 (-54 %). Die Inhibierung dieser Interleukinsekretionen erfolgte durch DPT dahingehend, dass für 2x C_{max} an DPT die deutlichsten Inhibierungen und somit die niedrigsten Freisetzungsraten an IL-1 β , -6 und -8 auftraten. Für PMN nach CLI-Inkubation ergab sich eine geringfügige Senkung in der IL-1 β -Sekretion (-13,0 %), während die Freisetzung von IL-6 durch CLI unbeeinflusst blieb. Die Sekretion von IL-8 wurde durch CLI konzentrationsabhängig mit steigender CLI-Konzentration erhöht, wobei es für C_{max} und 2x C_{max} gegenüber Kontrollen zu einer signifikanten Steigerung der IL-8-Freisetzung kam.

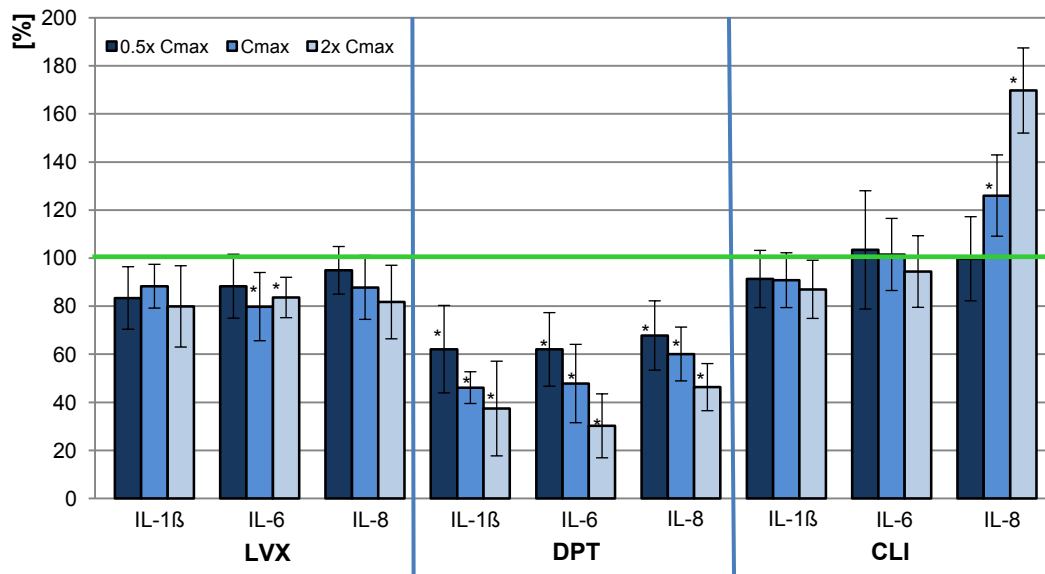


Abb. 11: Freisetzung von IL-1 β , -6 und -8 durch PMN, die für 18 h mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an LVX, DPT oder CLI inkubiert wurden, MW \pm STABW, n=7.

Für PMN nach CLI-Inkubation ergab sich eine geringfügige Senkung in der IL-1 β -Sekretion (-13,0 %), während die Freisetzung von IL-6 durch CLI unbeeinflusst blieb. Die Sekretion von IL-8 wurde durch CLI konzentrationsabhängig mit steigender CLI-Konzentration erhöht, wobei es für C_{\max} und $2x C_{\max}$ gegenüber Kontrollen zu einer signifikanten Steigerung der IL-8-Freisetzung kam.

4.3 Untersuchungen zur SPME von freien Arzneistoffkonzentrationen

4.3.1 Evaluation von optimierten SPME-Versuchsbedingungen

Zur Evaluation von SPME-Fasern für die quantitative Bestimmung von freien Arzneistoffkonzentrationen wurden vier verschiedene Faserbeschichtungen, von denen drei (PPy, PTh, PEDOT) manuell in Eigenherstellung und eine industriell (PAN-C18) angefertigt wurden, verwendet. Im Folgenden wurden systematische Untersuchungen zum Einfluss wichtiger Versuchsparameter auf die Extraktionsausbeuten der Fasern durchgeführt, wobei stets ein Parameter variiert und die anderen konstant gehalten wurden. Zu den untersuchten Parametern zählten dabei die Faserbeschaffenheit, Extraktionszeiten, Temperaturen, pH-Werte, Agitation, Blutantikoagulation sowie die Salzzusatzkonzentration.

Dabei kamen vier Arzneistoffe mit unterschiedlichen PPB zum Einsatz: LNZ und LVX mit 31 %^{138, 142} bzw. 24 - 38 % PPB¹³¹⁻¹³³ als Vertreter der Substanzen mit niedrigen PPB, während DPT mit 90 - 94 % PPB¹²¹ und SRL mit einer Inkorporationsrate von 94,5 % in Erythrozyten und 97,5 % PPB^{150, 151} zu den Substanzen gehören, die eine hohe Bindung an Matrixbestandteile besitzen. Für die SPME-Versuche wurde mit LVX zusätzlich zu LNZ eine zweite Substanz mit einer niedrigen PPB gewählt, da LVX bereits bei den Untersuchungen zum Einfluss von Antibiotika auf spezifische Zellfunktionen der PMN eingesetzt wurde.

4.3.1.1 Beschaffenheit der Faserbeschichtungen

SEM-Aufnahmen^{98, 102} der beschichteten Fasern (Abb. 12) erlaubten eine Charakterisierung der Beschichtungsmorphologie und somit Aussagen zur Homogenität und Porosität sowie der Partikelgröße der Polymerbeschichtungen.

Die Filmdicken der Beschichtungen betrugen 90 – 100 μm für PPy bzw. 135 – 160 μm für PTh und PEDOT. Die Polymeroberfläche zeigte unterschiedlich poröse Strukturbereiche: Die vom Trägerstab distale Schicht erschien inhomogen mit unregelmäßig geformten Partikeln, während die proximalen Schichten gleichmäßig ausgeprägt wirkten. Die gesamte Polymerbeschichtung bestand aus miteinander verbundenen, flocken- und tropfenförmigen Partikeln mit einer gering variierenden Partikelgröße von 1,5 – 2,0 μm .

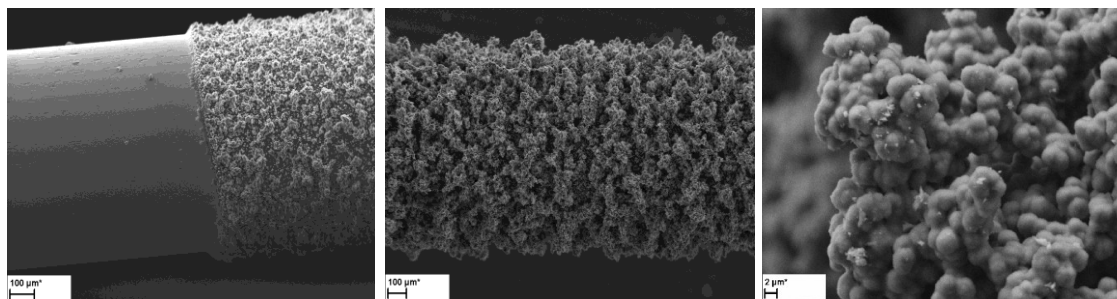


Abb. 12: SEM-Aufnahmen einer PPy-beschichteten SPME-Sonde: Übergang zwischen dem Trägermaterial und der Polymerbeschichtung (links), Draufsicht auf die PPy-Beschichtung (Mitte), Aufnahme einer einzelnen Pore und der PPy-Partikel (rechts)⁹⁸.

Untersuchungen zum Einfluss der Dicke und Länge des PPy-Films auf die Extraktionsausbeute von 15,0 mg/L LNZ aus PBS ergaben eine Steigerung der Ausbeuten mit zunehmender Dicke und Länge der Polymerbeschichtung (Abb. 13). Der

lineare Zusammenhang ($R^2 = 0,9422$) konnte durch eine Regressionsanalyse belegt werden.

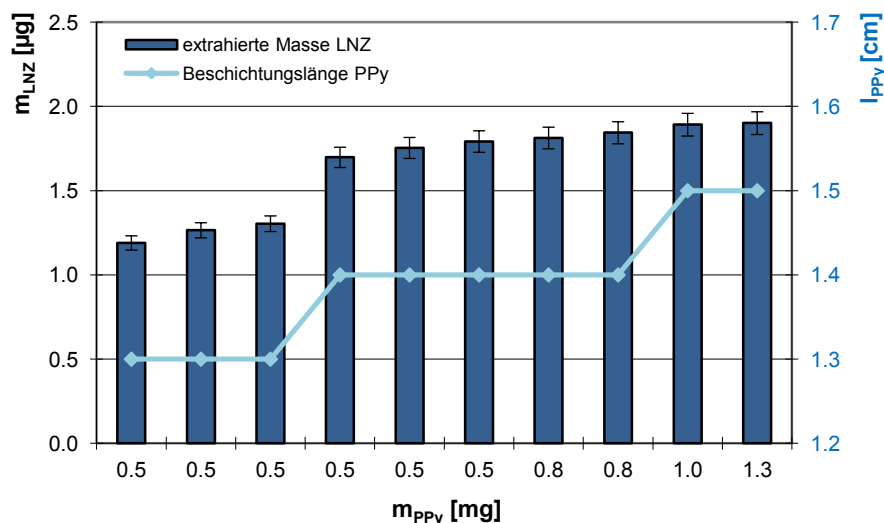


Abb. 13: Einfluss der Beschichtungslänge und –masse an PPy auf die Extraktionsausbeuten von 15,0 mg/L LNZ aus PBS, MW \pm STABW, $n=3$.⁹⁸

4.3.1.2 Polymerbeschichtungen der Fasern, Extraktionszeiten und –temperaturen

Aufgrund der deutlichen Unterschiede in den Molmassen der eingesetzten Arzneistoffe (Tab. 2), erschien es partiell für einen Vergleich der mittels SPME extrahierten Konzentrationen zwischen den einzelnen Arzneistoffen als angebracht, anstatt der Massenkonzentrationsangaben C [mg/L] die Stoffmengenkonzentrationen C [μ mol/L] zu verwenden (Tab. 4).

Arzneistoff	C-Bereich	C [mg/L]	C [μ mol/L]
DPT	0,5x C_{max}	30	18,5
	C_{max}	60	37,0
	2x C_{max}	120	74,0
LVX	0,5x C_{max}	2,5	6,9
	C_{max}	5,0	13,8
	2x C_{max}	10,0	27,6
SRL		0,10	0,11

Tab. 4: Gegenüberstellung der Massenkonzentrationen [mg/L] und Stoffmengenkonzentrationen [μ mol/L] von DPT, LVX und SRL.

Bei Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit des Adsorptionsverhaltens von vier unterschiedlichen SPME-Sonden gegenüber DPT und LVX aus PBS sowie SRL aus Vollblut zeigte sich, dass die erzielten Extraktionsausbeuten für die einzelnen Analyten durch die unterschiedlichen Fasern voneinander variierten (Abb. 14).

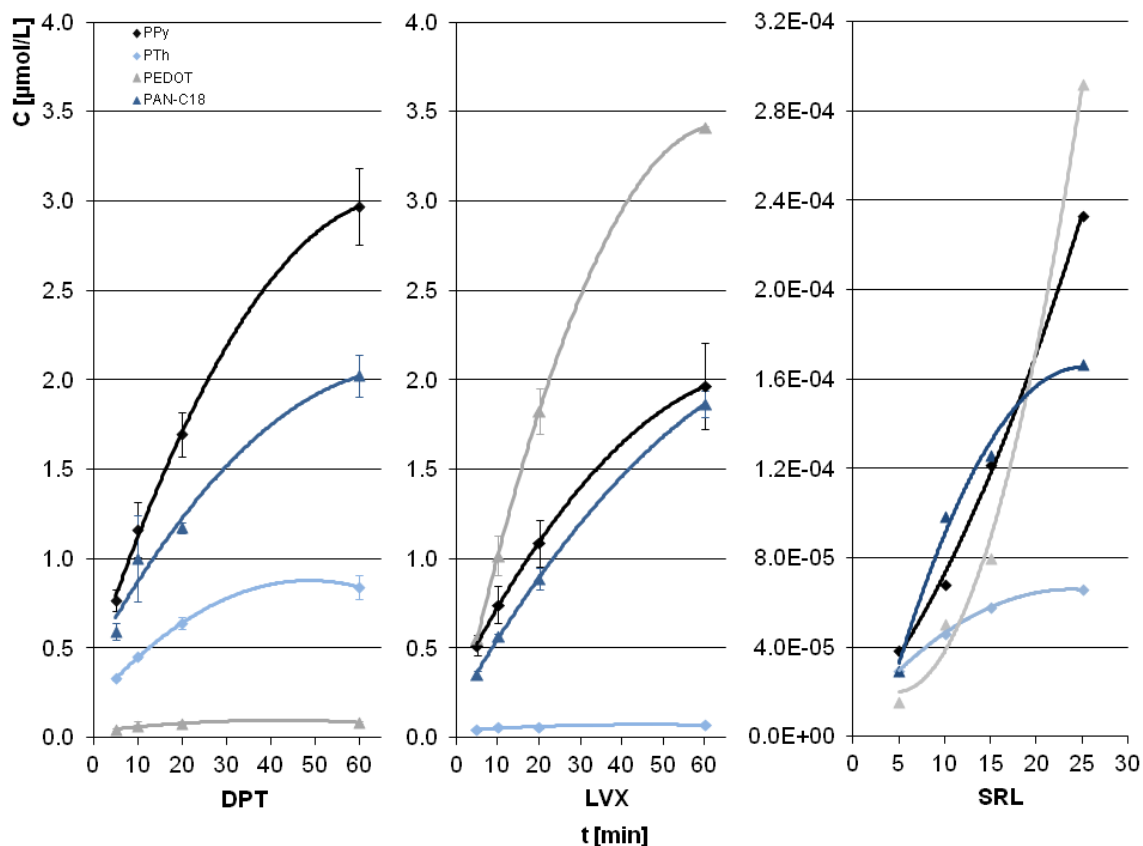


Abb. 14: Einfluss der Adsorptionszeit auf die Extraktionsausbeuten von vier verschiedenen SPME-Fasern für C_{\max} an DPT (37,0 μmol/L) und LVX (13,8 μmol/L) aus PBS (MW ± STABW, n=6) sowie von SRL (0,11 μmol/L) aus humanem Vollblut (n=1).

Ein Vergleich der vier Faserbeschichtungen je Arzneistoff ergab, dass für DPT die Sonden mit PPy-Beschichtungen die höchsten Extraktionsausbeuten (8,0 %) erbrachten, gefolgt von PAN-C18-, PTh- und PEDOT-beschichteten Fasern mit 5,5 – 0,2 %. Letzterer Beschichtungstyp erzielte hingegen für LVX die höchste Extraktionsausbeute (24,6 %), während PTh-beschichtete Sonden eine unzureichende Extraktionsleistung aufwiesen. PPy- und PAN-C18-beschichtete Fasern erbrachten mit ~14 % vergleichbare Extraktionsausbeuten. Für die SPME von SRL aus Vollblut ergab sich, dass die höchsten

Ausbeuten durch PEDOT- (0,27 %) erzielt wurden, gefolgt von PPy-, PAN-C18- und PTh-beschichteten Fasern mit 0,21 - 0,06 %.

Eine Verlängerung der Adsorptionszeit von 20 auf 60 min führte zu deutlich gesteigerten Extraktionsausbeuten für DPT (PPy: +75 %, PAN-C18: +73 %, PTh: +23 %) und LVX (PPy: +81 %, PAN-C18: +110 %, PEDOT: +87 %) aus PBS.

Es zeigte sich darüber hinaus, dass es nicht unbedingt zu einem Sättigungsphänomen bezüglich der Extraktionsausbeuten der SPME-Fasern im Untersuchungszeitraum kam. Degressiv ansteigende Kurvenverläufe resultierten für die Extraktionsausbeuten von DPT, LVX und SRL in Abhängigkeit von der Adsorptionszeit. Für SRL deuteten lediglich PPy- und PEDOT-beschichtete Fasern nach 25 min kein Sättigungsverhalten an, jedoch ist aufgrund der geringen n-Zahl eine präzise Aussage über das Extraktionsverhalten nicht möglich.

Zur Extrapolation der Sättigungskonzentration ($f(x)$ für den Wert x , für den $f(x)' = 0$ gilt) und des Zeitpunktes t , an dem es zur Sättigung in den Extraktionsausbeuten kommt ($f(x)' = 0$), wurden die ersten Ableitungen ($f(x)'$) der Regressionsfunktionen gebildet (Tab. 5).

Es zeigte sich, dass für die SPME von C_{\max} an DPT und LVX mindestens eine Adsorptionszeit von 40 min, in vielen Fällen sogar von mehr als 60 min, erforderlich war, bevor die SPME-Fasern in den Extraktionsausbeuten ein Sättigungsverhalten aufwiesen.

Arzneistoff	Faserbeschichtung	Regressionsfunktion (Bestimmtheitsmaß)	$C_{\text{Sättigung}}$ [$\mu\text{mol/L}$]	t für $C_{\text{Sättigung}}$ [min]
DPT	PPy	$f(x) = -0,000542x^2 + 0,074824x + 0,04307$ ($R^2 = 0,9992$)	3,01	69,0
	PTh	$f(x) = -0,000286x^2 + 0,027917x + 0,19748$ ($R^2 = 0,9999$)	0,88	48,7
	PEDOT	$f(x) = -0,000036x^2 + 0,002983x + 0,03333$ ($R^2 = 0,9676$)	0,09	41,6
	PAN-C18	$f(x) = -0,000311x^2 + 0,044681x + 0,45698$ ($R^2 = 0,9760$)	2,06	71,9

LVX	PPy	$f(x)=-0,000293x^2+0,045177x+0,30571$ ($R^2=0,9997$)	2,05	77,1
	PTh	$f(x)=-0,000016x^2+0,001441x+0,03858$ ($R^2=0,9055$)	0,07	45,0
	PEDOT	$f(x)=-0,000823x^2+0,105538x+0,04335$ ($R^2=1,0000$)	3,43	64,1
	PAN-C18	$f(x)=-0,000202x^2+0,040408x+0,16590$ ($R^2=0,9997$)	2,19	100,0
SRL	PTh	$f(x)=-1,02 \cdot 10^{-7}x^2+4,9 \cdot 10^{-6}x+7,6 \cdot 10^{-6}$ ($R^2=0,9998$)	$6,6 \cdot 10^{-5}$	23,9
	PAN-C18	$f(x)=-3 \cdot 10^{-7}x^2+0,000016x-0,000042$ ($R^2=0,9888$)	$1,6 \cdot 10^{-4}$	25,7

Tab. 5: Zusammenstellung der extrapolierten Sättigungskonzentrationen für die SPME von C_{\max} an DPT (37,0 $\mu\text{mol/L}$), LVX (13,8 $\mu\text{mol/L}$) und SRL (0,11 $\mu\text{mol/L}$) unter Verwendung von vier verschiedenen Faserbeschichtungen sowie Angabe der Adsorptionszeiten, die zum Erreichen der Sättigungskonzentrationen erforderlich sind.

Untersuchungen zum Einfluss der Desorptionszeit auf die Extraktionsausbeuten erfolgten nach Adsorption von C_{\max} an DPT in PBS und ergaben, dass der Hauptanteil an DPT (83 - 94 %) bereits nach 20 min von den Fasern desorbiert wurde (Abb. 15). Eine Verdreifachung der Desorptionszeit (60 min) resultierte in Steigerungen der Extraktionsausbeuten gegenüber den 20 min – Werten um +20 % (PPy, PAN-C18) und +7 % (PTh).

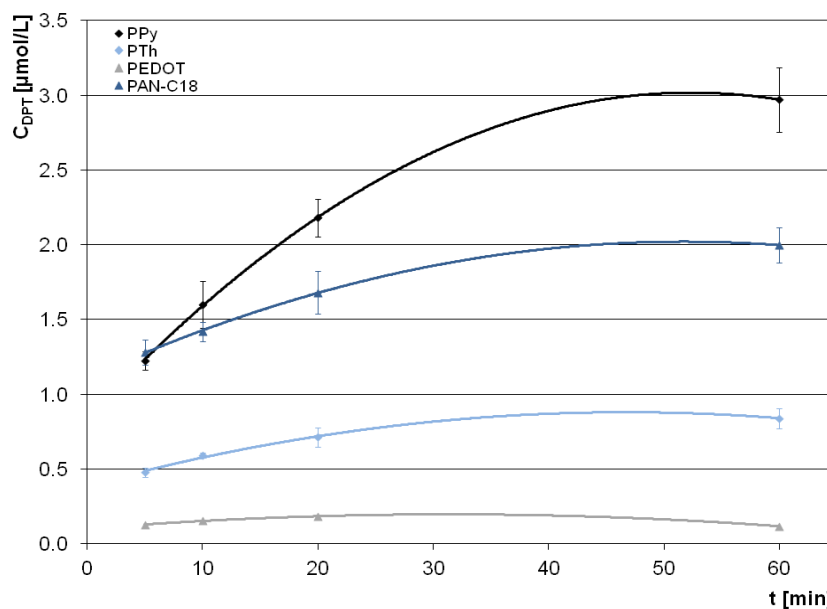


Abb. 15: Einfluss der Desorptionszeit auf die Extraktionsausbeute von C_{\max} an DPT (37,0 $\mu\text{mol/L}$) nach Adsorption aus PBS, MW \pm STABW, n=6.

Die zur Einstellung der Sättigungskonzentrationen benötigten Desorptionszeiten der vier eingesetzten Faserbeschichtungen sind in Tabelle 5 angegeben. Wie aus Abbildung 15 ersichtlich ist, könnten bereits zu einem früheren Zeitpunkt die Desorptionsdauern beendet werden, ohne dass es zu einem merkbaren Verlust in den Extraktionsausbeuten käme. In Tabelle 6 sind zusätzlich die kalkulierten Desorptionszeiten für einen Verlust von 5 % Extraktionsausbeute ($f(x)_{\text{reduziert}} = 0,95 \cdot f(x)$) gegenüber den nach 60 min erzielten Werten angegeben.

Faserbe- schichtung	Regressionsfunktion (Bestimmtheitsmaß)	t für $C_{\text{Sättigung}}$ [min]	t für $f(x)_{\text{red}} = 0,95 \cdot f(x)$ [min]
PPy	$f(x) = -0,000796x^2 + 0,083342x + 0,83592$ ($R^2 = 0,9999$)	52,3	37,8
PTh	$f(x) = -0,000225x^2 + 0,021038x + 0,38806$ ($R^2 = 0,9958$)	46,8	28,8
PEDOT	$f(x) = -0,000097x^2 + 0,006079x + 0,10104$ ($R^2 = 0,9901$)	31,3	–
PAN-C18	$f(x) = -0,000341x^2 + 0,035234x + 1,10885$ ($R^2 = 0,9760$)	51,7	33,1

Tab. 6: Angabe der Desorptionszeiten, die zum Erreichen der Sättigungskonzentration nach Adsorption von C_{max} an DPT ($37,0 \mu\text{mol/L}$) aus PBS erforderlich waren sowie Angabe der kalkulierten reduzierten Desorptionszeiten, für die ein Verlust von 5 % der Extraktionsausbeute an DPT akzeptiert wurde.

Es zeigte sich, dass für PPy-, PTh- und PAN-C18-beschichtete Fasern eine Reduzierung der Desorptionszeit um 14,5 - 18,5 min erzielt werden würde, wenn ein Verlust von 5 % Extraktionsausbeute an DPT, welcher im Standardabweichungsbereich des Wertes für die Extraktionsausbeute nach 60 min liegt, toleriert wird.

Variationen in den Adsorptions- ($25 - 45^\circ\text{C}$) und Desorptionstemperaturen ($30 - 60^\circ\text{C}$) für die Extraktion von C_{max} an DPT aus PBS führten zu keiner signifikanten Beeinflussung der Extraktionsausbeuten. Die mittels PAN-C18-Fasern extrahierten C_{DPT} betrugen beispielsweise nach Variation der Adsorptionstemperatur $2,02 \pm 0,12 \mu\text{mol/L}$ und nach Veränderung der Desorptionstemperatur $2,04 \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$.

4.3.1.3 Blutantikoagulantien, Salzkonzentration und pH-Wert

Blutantikoagulantien wie Natriumzitrat und Heparin schienen die Extraktionsausbeuten von PPy-beschichteten Fasern für 15,0 mg/L LNZ/Plasma bei einem physiologischen pH-Wert von ~7,4 nicht zu beeinflussen, während EDTA zu einer Senkung der Ausbeute um -55 % führte (Abb. 16).

Für höhere pH-Werte (8,5), wie sie sich nach Antikoagulation mit Natriumzitrat ausbilden, deutete sich eine Steigerung der extrahierten Masse an LNZ um ~20 % an, während die Zugabe von Natriumchlorid in unterschiedlichen Konzentrationen keinen wesentlichen Einfluss auf die Extraktionsausbeute an LNZ aufzeigte.

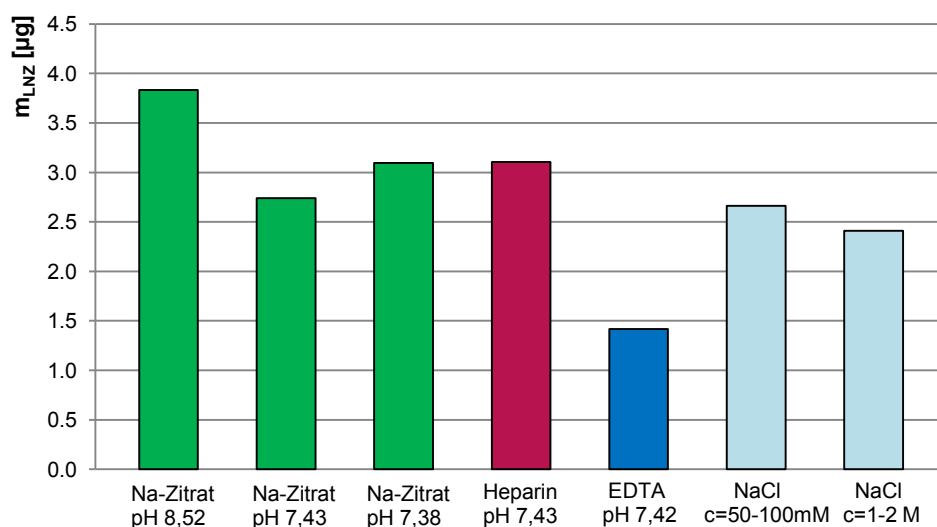


Abb. 16: Einfluss von Blutantikoagulantien (Natriumzitrat, Heparin, EDTA), Natriumchloridkonzentration sowie des pH-Wertes auf die Extraktionsausbeute von 15,0 mg/L LNZ aus Plasma mittels PPy-beschichteten SPME-Sonden, $n=1$.⁹⁸

Für die Extraktion von SRL aus EDTA-antikoaguliertem Vollblut mit PAN-C18-beschichteten Fasern zeigte sich, dass SRL über den gewählten Konzentrationsbereich linear extrahierbar war (Abb. 17). Unter Verwendung von Heparin-antikoaguliertem Vollblut waren für die kleineren C_{SRL} (15 und 20 µg/L) keine extrahierten C_{SRL} bestimmbar. Ein Vergleich der Anstiege beider Regressionsfunktionen zeigt auf, dass für EDTA-antikoaguliertes Vollblut aufgrund der extrahierten C_{SRL} eine deutlichere Differenzierung hinsichtlich der eingesetzten C_{SRL} möglich ist, während für Heparin-antikoaguliertes Vollblut die Unterschiede in den einzelnen Konzentrationsniveaus geringer ausgeprägt sind.

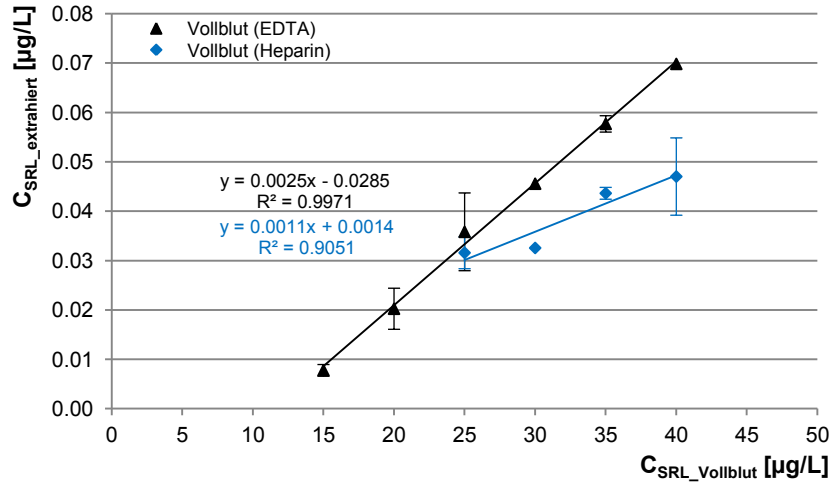


Abb. 17: Einfluss der Blutantikoagulantien EDTA und Heparin auf die Extraktion von SRL aus Vollblut mittels PAN-C18-beschichteten SPME-Fasern, MW \pm Bereich, n=2.

4.3.1.4 Agitation der Adsorptionslösung

Für die SPME von SRL aus Vollblut mit PTh-beschichteten Fasern ergab sich ein deutlicher Unterschied in den Extraktionsausbeuten in Abhängigkeit von der Bewegungsart der Adsorptionslösung, wobei mit 0,14 – 0,20 % die höchsten Extraktionsausbeuten an SRL im fließenden System (HLM) erzielt wurden (Tab. 7). Für gerührte und geschüttelte Medien resultierten SRL-Ausbeuten von 0,08 – 0,12 % und 0,01 – 0,03 %. Der Unterschied in den erzielten Extraktionsausbeuten an SRL in den verwendeten Bewegungsmodi (schütteln versus rühren, rühren versus fließend) betrug das $\sim 2 - 2,5$ fache.

	Bewegungsmodus des Vollblutes		
	schütteln (400 rpm)	rühren (250 rpm)	fließend (100 mL/min)
$C_{SRL_Vollblut}$ [µg/L]	C_{SRL} [µg/L]	C_{SRL} [µg/L]	C_{SRL} [µg/L]
25,0	0,004	$0,032 \pm 0,005$	$0,05 \pm 0,02$
50,0	0,015	$0,041 \pm 0,007$	$0,09 \pm 0,02$
100,0	0,031 (n=1)	$0,080 \pm 0,007$ (n=5)	$0,14 \pm 0,01$ (n=3)

Tab. 7: Extrahierte Konzentrationen an SRL mit PTh-beschichteten Sonden aus Vollblut unter Variation der Bewegungsart des Vollblutes, MW \pm STABW.

Diese Ergebnisse zeigten, dass deutliche Unterschiede in den Bewegungsmodi einen Einfluss auf die Extraktionsleistung der Fasern haben können, während begrenzte Variationen in den Schüttelgeschwindigkeiten des Thermoshakers für die Adsorption und Desorption (0 - 500 rpm) von DPT aus PBS mittels der vier eingesetzten Faserarten zu keinen signifikanten Unterschieden in den Extraktionsausbeuten an DPT führten. Bei Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Flussraten des fließenden Vollblutes (50 – 500 mL/min) auf die Extraktion von LNZ und DPT mittels PPy- bzw. PTh-beschichteten Fasern (Abb. 18) konnte ebenfalls keine signifikante Abhängigkeit der Extraktionsausbeute von der Fließgeschwindigkeit festgestellt werden^{98, 102}.

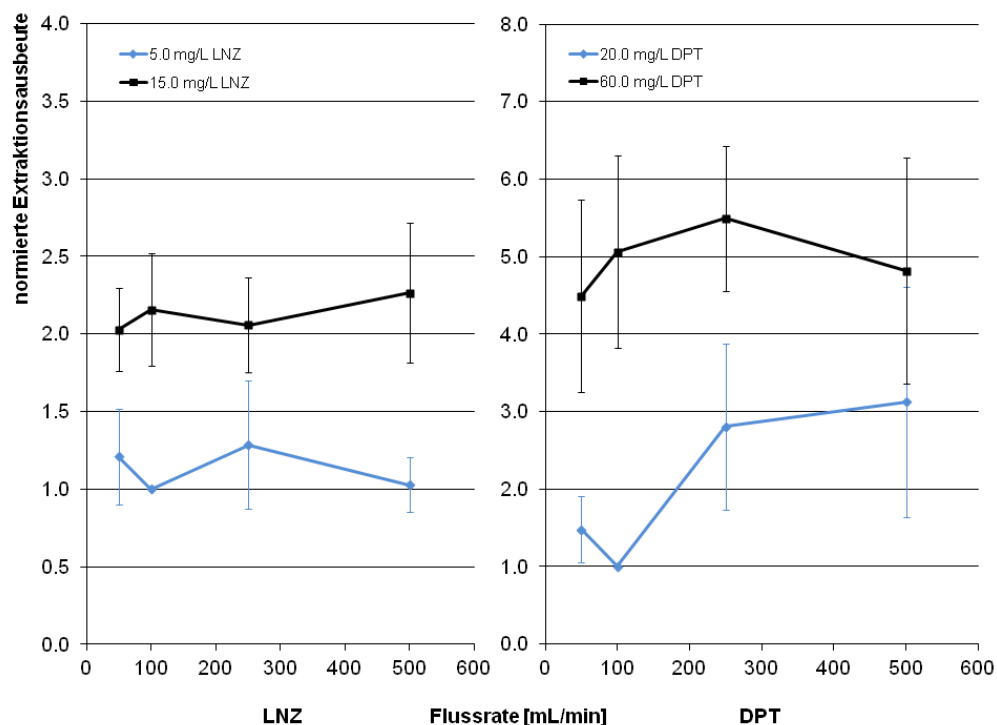


Abb. 18: Effekt von variierten Flussraten des Vollblutes auf die Extraktionsausbeuten von LNZ (5,0 bzw. 15,0 mg/L) und DPT (20,0 bzw. 60,0 mg/L) mittels PPy-beschichteten Fasern (HLM-Modell), Normierung der Extraktionsausbeuten auf 5,0 mg/L LNZ bzw. 20,0 mg/L DPT bei 100 mL/min, MW \pm STABW, n=3.⁹⁸

4.3.2 SPME unter Verwendung des HLM-Modells

Untersuchungen zur SPM-Extraktion von LNZ und SRL mittels PPy- bzw. PTh-beschichteten Fasern aus fließendem oder geschütteltem Vollblut resultierten in hohen Reproduzierbarkeiten und linearen Konzentrationskorrelationen über den gewählten Konzentrationsbereichen (Tab. 8).

Arzneistoff	Faser (Faserstatus)	Agitations- modus	Bestimmt- heitsmaß (R^2)	CV _{max} [%]
LNZ	PPy (unbenutzt)	fließend	0,957 (n=3)	17,0
	PPy (benutzt)	fließend	0,939 (n=3)	7,0
	PPy (benutzt)	schüttelnd	0,955 (n=3)	9,0
	PTh (unbenutzt)	fließend	0,987 (n=3)	9,5
	PTh (benutzt)	fließend	0,995 (n=3)	15,9
	PTh (benutzt)	schüttelnd	0,983 (n=3)	7,1
DPT	PPy (unbenutzt)	fließend	0,965 (n=3)	14,5
	PPy (benutzt)	fließend	0,915 (n=3)	8,3
	PPy (benutzt)	schüttelnd	0,975 (n=3)	10,3
	PTh (unbenutzt)	fließend	0,967 (n=3)	11,8
	PTh (benutzt)	fließend	0,988 (n=3)	6,1
	PTh (benutzt)	schüttelnd	0,924 (n=3)	12,3
SRL	PPy (unbenutzt)	fließend	0,984 (n=1)	-
	PPy (benutzt)	fließend	0,997 (n=2)	19,1
	PPy (benutzt)	schüttelnd	0,991 (n=1)	-
	PTh (unbenutzt)	fließend	0,999 (n=3)	19,8
	PTh (benutzt)	fließend	0,998 (n=3)	21,1
	PTh (benutzt)	schüttelnd	0,999 (n=1)	-

Tab. 8: Zusammenstellung der Bestimmtheitsmaße und Messpräzisionen (Variationskoeffizient, CV_{maximal}) für die SPME von LNZ (1 - 15 mg/L), DPT (3 – 60 mg/L) und SRL (25-300 µg/L) aus Heparin-antikoaguliertem Vollblut mittels PPy- und PTh-beschichteten Fasern. Aufschlüsselung der Ergebnisse nach Faserstatus und Agitationsmodus.^{98, 102}

Während für die Extraktion von DPT mit PTh-beschichteten Sonden ebenfalls ein linearer Zusammenhang zwischen den dotierten und extrahierten C_{DPT} festgestellt werden konnte, ergab sich für die SPME mittels PPy-beschichteten Fasern eine degressive Zunahme in den extrahierten C_{DPT} in Abhängigkeit von den eingesetzten C_{DPT} (Abb. 19).

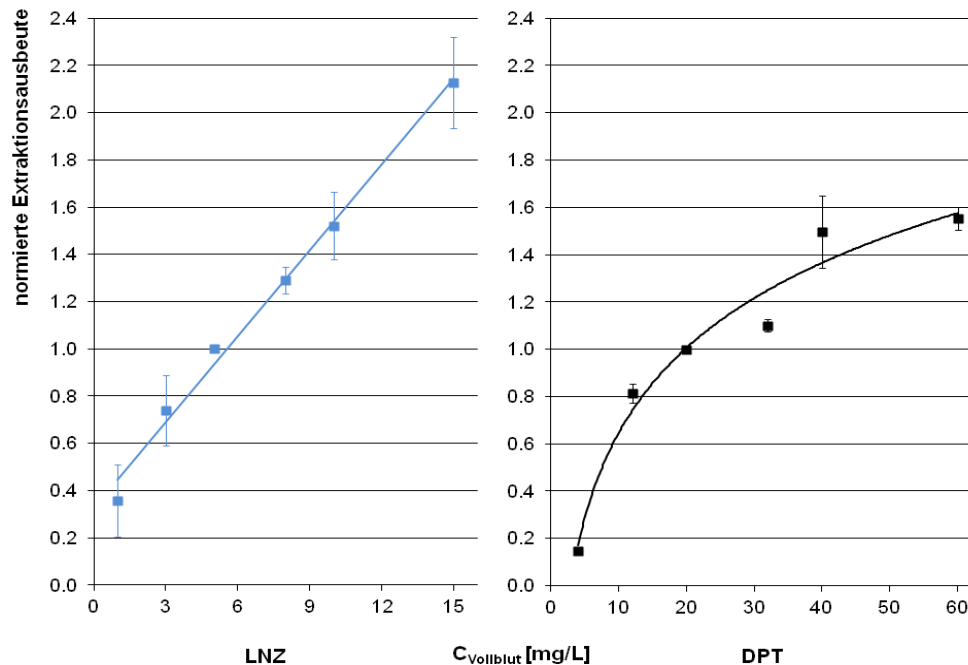


Abb. 19: Normierte SPM-Extraktionsausbeuten von LNZ ($C = 1,0 - 15,0$ mg/L) und DPT ($C = 4,0 - 60,0$ mg/L) mittels PPy-beschichteten Fasern (HLM-Modell) aus Heparin-antikoagulierte Vollblut, Normierung der Extraktionsausbeuten auf 5,0 mg/L LNZ bzw. 20,0 mg/L DPT, MW \pm STABW, $n=3$.⁹⁸

Es zeigte sich weiterhin, dass unbenutzte Fasern gegenüber zuvor verwendeten Sonden höhere Extraktionsausbeuten an LNZ, DPT und SRL erzielten. Für SRL (Abb. 20) erzielten beispielsweise unbenutzte PPy- und PTh-Fasern im fließenden Heparin-antikoagulierte Vollblut um +100 % gesteigerte Extraktionsausbeuten im Vergleich zu vorher benutzten Fasern. Der Unterschied zwischen unbenutzten Fasern im fließenden Medium und benutzten Sonden im geschüttelten System betrug Faktor 4 zugunsten der neuen Fasern. Bei Verwendung von jeweils zuvor unbenutzten PPy- und PTh-beschichteten SPME-Sonden ergab sich, dass PPy-Sonden verglichen mit PTh-beschichteten Fasern um $\sim +50$ % gesteigerte Extraktionsausbeuten an SRL aus humanem Vollblut erzielten.

Betrachtungen der Steigungen der Regressionsfunktionen zeigten, dass für zuvor unbenutzte Fasern (PPy, PTh) $\sim 1,8$ mal so steile Regressionsgeraden im Vergleich zu bereits benutzten Sonden resultierten. Dadurch ermöglichte der Einsatz von zuvor unbenutzten Fasern eine deutlichere Differenzierung hinsichtlich der im Vollblut enthaltenen C_{SRL} im Vergleich zu bereits benutzten Fasern. Im Gegensatz zu PTh-

beschichteten Fasern, bei denen unabhängig von einer vorigen Nutzung über den gesamten Konzentrationsbereich im fließenden Vollblut SRL extrahiert wurde, konnte für die dotierten $C_{\text{SRL}} \leq 50 \mu\text{g/L}$ mittels benutzter PPy-Sonden kein extrahiertes SRL nachgewiesen werden.

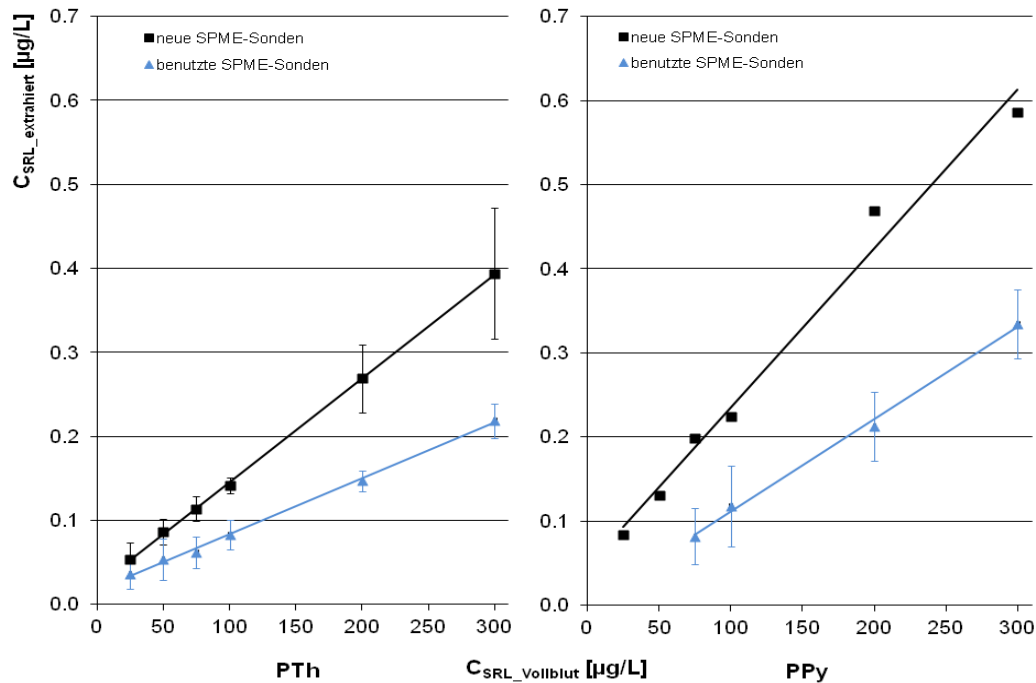


Abb. 20: Extraktionsausbeuten für SRL (25 – 300 $\mu\text{g/L}$) aus fließendem Heparin-antikoaguli-ertem Vollblut durch neue unbenutzte und zuvor bereits benutzte PTh- bzw. PPy-beschichtete SPME-Fasern bei einer Flussrate von 100 mL/min, MW \pm STABW, n=3.

4.4 SPME von SRL aus einer Patientenprobe

Für eine Patientenprobe, die laut einer externen quantitativen Bestimmung 24 $\mu\text{g/L}$ SRL enthielt, wurde jeweils mit einer PPy-, PTh- und einer PANC18-beschichteten Faser Extraktionen durchgeführt. Die erzielten SRL-Signalfächen wurden über eine externe Kalibrierung von SRL in CH_3OH in SRL-Konzentrationen umgerechnet und es resultierte für die PPy-beschichtete Faser eine kalkulierte Ausgangskonzentration an SRL von 27,7 $\mu\text{g/L}$, während sich für PTh- und PANC18-beschichtete Sonden 13,6 $\mu\text{g/L}$ bzw. 17,8 $\mu\text{g/L}$ an SRL ergaben.

4.5 Konventionelle Arzneistoffanalysen

Referenzanalysen von LNZ und SRL aus Vollblut mittels SPE ergaben lineare Regressionsfunktionen und hohe Reproduzierbarkeiten von $R^2 = 0,998$ ($\text{CV} \leq 8,0 \%$,

$n=3$)⁹⁸ für LNZ- und $R^2 = 0,997$ ($CV \leq 10,6 \%$, $n=2$) für SRL-haltige Proben. Für Vollblutproben, die DPT enthielten, wurde für die Konzentrationsbestimmungen nach Zentrifugation, Proteinfällung und linearer Regressionsanalyse ein $R^2 = 0,999$ ($CV \leq 4,0 \%$, $n=3$)¹⁰² erhalten.

4.6 Bestimmung der PPB mittels SPME

Für die Untersuchungen zum Extraktionsverhalten von C_{\max} an DPT aus Matrices mit unterschiedlichem Proteinanteil wurde neben PBS und humanem Heparin-Plasma mit Biseko® ein standardisiertes artifizielles Proteinkonzentrat verwendet, das keine humanen Zellen enthält und somit im Gegensatz zu Heparin-Plasma eine direkte Aussage über den Bindungsgrad des Arzneistoffes an Proteine ermöglicht.

In den Untersuchungen zeigte sich, dass die Extraktionsausbeuten der verschiedenen Sondenbeschichtungen stark voneinander variierten und eine teilweise signifikante Abnahme der extrahierten C_{DPT} mit steigenden Proteingehalt auftrat (Abb. 21). Vergleichbare Extraktionsprofile ergaben sich für die SPME von $0,5x C_{\max}$ und $2x C_{\max}$ an DPT mit Ausnahme einer erniedrigten ($0,5x C_{\max}$) oder einer erhöhten ($2x C_{\max}$) extrahierten Masse an DPT. Mit PEDOT beschichtete Fasern erwiesen sich für die SPME von DPT aus proteinhaltigen Matrices und somit für die Bestimmung der PPB als ungeeignet, da die Fasern aus proteinhaltigen Matrices keine relevanten und voneinander unterscheidbare C_{DPT} extrahierten.

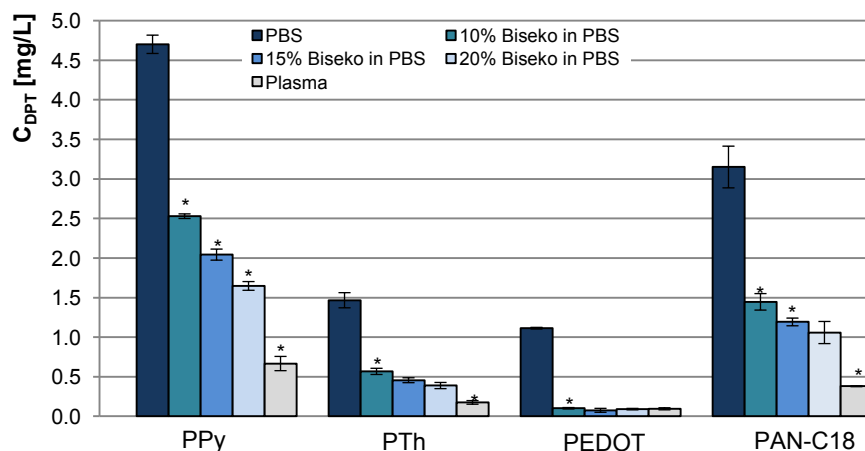


Abb. 21: SPM-Extraktionsprofile von C_{\max} an DPT (60,0 mg/L) aus Matrices mit unterschiedlichem Proteingehalt, MW \pm STABW, $n=6$.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der mittels PPy-, PTh- und PAN-C18-beschichteten Sonden erzielten Extraktionsausbeuten (EA) und der daraus berechneten Proteinbindungen von DPT (Tab. 9) wurden die prozentualen Differenzen zwischen den einzelnen Werten ($\Delta EA_1/EA_2$, z.B. zwischen 15 und 10 % Biseko[®], 20 und 15 % Biseko[®]) gebildet.

	PPy		PTh		PAN-C18	
	C_{DPT}/C_{DPT_PBS} (%)	$\Delta EA_1/EA_2$ (%)	C_{DPT}/C_{DPT_PBS} (%)	$\Delta EA_1/EA_2$ (%)	C_{DPT}/C_{DPT_PBS} (%)	$\Delta EA_1/EA_2$ (%)
10% Biseko[®]	53,8	-19,2	38,7	-19,7	45,9	-17,6
PPB (%)	46,2		61,3		54,1	
15% Biseko[®]	43,5	-19,4	31,1	-14,7	37,9	-11,2
PPB (%)	56,5		68,9		62,1	
20% Biseko[®]	35,0	-59,5	26,5	-54,8	33,6	-64,1
PPB (%)	65,0		73,5		66,4	
Plasma	14,2		12,0		12,1	
PPB (%)	85,8		88,0		87,9	

Tab. 9: Zusammenstellung der berechneten Unterschiede zwischen den Extraktionsausbeuten in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Adsorptionslösungen und der Art der Faserbeschichtung.

Es zeigte sich, dass eine schrittweise Erhöhung des Proteingehaltes um 5 % für die Extraktion von DPT mittels PPy-beschichteten Sonden zu einer konstanten Verminderung der Extraktionsausbeute um -19 % führte, während für PTh- und PAN-C18-Fasern initial eine vergleichbar, aber dann geringer fortschreitende Reduktion der SPME-Ausbeuten auftrat. Die sich ergebenden prozentualen Reduktionen in den Extraktionsausbeuten aus Heparin-Plasma gegenüber PBS (85 - 88 %) entsprechen den PPB von DPT in humanem Heparin-Plasma und waren für die drei Sondenbeschichtungen vergleichbar.

Der Verlauf der PPB in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Adsorptionslösung war degressiv ansteigend und wies für niedrige Proteingehalte (< 20 %) einen Unterschied zwischen den eingesetzten SPME-Sondenbeschichtungen auf (Abb. 22).

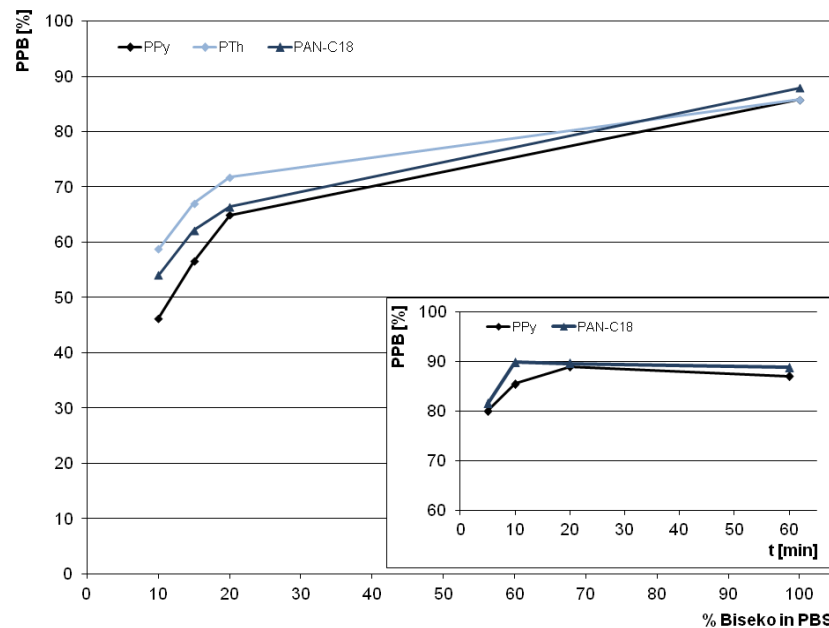


Abb. 22: Mögliche Verläufe der mittels SPME-Sonden (PPy, PTh, PAN-C18) bestimmten Plasmaproteinbindungen (PPB) von C_{\max} an DPT (60,0 mg/L) in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Adsorptionslösung; *Einschub*: Verlauf der PPB in Abhängigkeit von der Adsorptionszeit (5-60 min) von C_{\max} an DPT (60,0 mg/L) aus Heparin-Plasma mittels PPy- und PAN-C18-beschichteten Sonden.

Es zeigte sich weiterhin, dass der Einfluss der Adsorptionszeit auf die Bestimmung der extrahierten Konzentrationsanteile an DPT und somit auf die berechneten Proteinbindungen nur gering ausgeprägt war (Abb. 22, *Einschub*). Für Adsorptionszeiten von $t \geq 10$ min ergaben sich für C_{\max} an DPT in Heparin-Plasma folgende PPB: 85 – 90 % durch PPy- und ~89 % durch PAN-C18-Fasern. Lediglich die kalkulierten PPB nach 5 minütiger Adsorptionszeit waren mit ~80 % geringfügig erniedrigt. Die für niedrigere und höhere C_{DPT} berechneten PPB lagen in einer zu C_{\max} vergleichbaren Größenordnung (Tab. 10).

Fasertyp	0,5x C_{\max} PPB (%)	2x C_{\max} PPB (%)
PPy	81 - 84	83 – 86
PTh	~80	~88
PAN-C18	86 - 88	87 – 90

Tab. 10: Berechnete PPB nach SPME (60 min) von zwei C_{DPT} aus Heparin-Plasma mittels PPy-, PTh- und PAN-C18-beschichteten Sonden, Angabe des Bereiches, n=3.

Untersuchungen zum Extraktionsverhalten von vier verschiedenen SPME-Sonden gegenüber LVX ($0,5 - 2 \times C_{\max}$) ergaben ebenfalls eine Minderung der extrahierten C_{LVX} mit steigendem Proteinanteil in der Adsorptionslösung und durch die Wahl des Beschichtungsmaterials bedingte Unterschiede in den extrahierten Konzentrationsanteilen von LVX (Abb. 23).

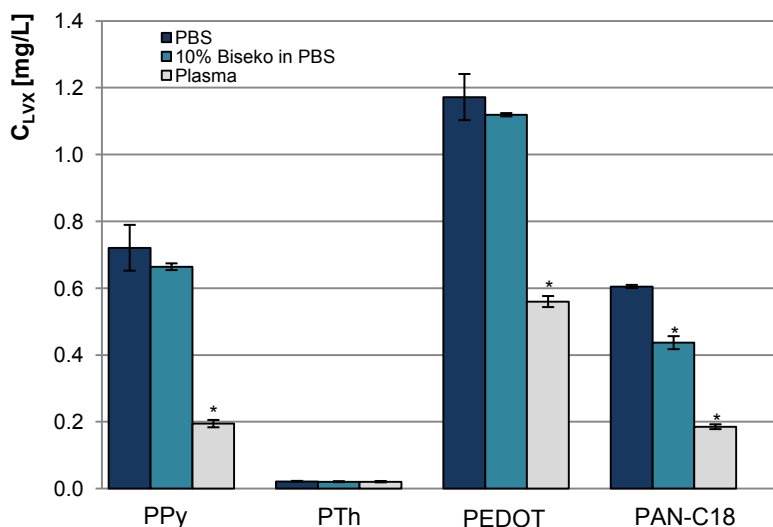


Abb. 23: Verlauf der mittels SPME-Sonden (PPy, PTh, PEDOT, PAN-C18) extrahierten C_{LVX} nach Adsorption (60 min) von C_{\max} an LVX (5,0 mg/L) aus Matrices mit unterschiedlichem Proteingehalt, MW \pm STABW, n=6.

Mit PTh beschichtete Fasern erwiesen sich für die SPME von LVX aus proteinhaltigen Matrices und somit für die Bestimmung der PPB als ungeeignet, da die Fasern keine relevanten und voneinander unterscheidbaren C_{LVX} extrahierten. Für eine bessere Vergleichbarkeit der mittels PPy-, PEDOT- und PAN-C18-beschichteten Sonden erzielten Extraktionsausbeuten und der daraus berechneten Proteinbindungen von LVX (Tab. 11) wurden wieder die prozentualen Differenzen zwischen den einzelnen Werten ($\Delta EA_1/EA_2$, zwischen Heparin-Plasma und 10 % Biseko[®]/PBS) gebildet.

Es zeigte sich, dass für die Extraktion von LVX mittels PPy- und PEDOT-beschichteten Sonden eine geringfügige Verminderung der Extraktionsausbeuten aus 10 % Biseko[®]/PBS auftrat, während für PAN-C18-Fasern eine deutlich stärkere Reduktion der SPME-Ausbeuten auftrat. Die sich ergebenden prozentualen Reduktionen der Extraktionsausbeuten aus Heparin-Plasma gegenüber PBS waren für PPy- und PAN-

C18-Sondenbeschichtungen vergleichbar, während die Reduktion der Extraktionsausbeute an LVX durch PEDOT-beschichtete Fasern geringer ausfiel (~18 %).

	PPy		PEDOT		PAN-C18	
	C_{LVX}/C_{LVX_PBS} (%)	$\Delta EA_1/EA_2$ (%)	C_{LVX}/C_{LVX_PBS} (%)	$\Delta EA_1/EA_2$ (%)	C_{LVX}/C_{LVX_PBS} (%)	$\Delta EA_1/EA_2$ (%)
10% Biseko®	92,1	-70,7	95,5	-50,0	72,2	-57,6
PPB (%)	7,9		4,5		27,8	
Plasma	27,0		47,8		30,6	
PPB (%)	73,0		52,2		69,4	

Tab. 11: Zusammenstellung der berechneten Unterschiede zwischen den Extraktionsausbeuten in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Adsorptionslösung und der Art der Faserbeschichtung.

Die für $0,5x C_{max}$ und $2x C_{max}$ an LVX berechneten PPB lagen in einer zu C_{max} vergleichbaren Größenordnung und betrugen 69 – 72 % (PPy), 54 – 58 % (PEDOT) und ~69 % für PAN-C18-beschichtete Sonden.

4.7 Bestimmung der PPB mittels UF

Die Ermittlung der PPB von DPT mittels UF-Zentrifugaleinheiten resultierte in einer Abhängigkeit der berechneten PPB-Werte vom Proteingehalt der Matrix. Für DPT ergaben sich ~99 % PPB in Heparin-Plasma, 56 – 94 % PPB in zuvor bereits ultrafiltriertem Heparin-Plasma (Plasma PP < 10 kDa), 79 – 96 % PPB in 10 % Biseko®/PBS sowie ~83 % bzw. ~89 % PPB in 15 % und 20 % Biseko®/PBS (Abb. 24).

Während die PPB für DPT aus Heparin-Plasma über den gewählten Konzentrationsbereich in einem konstanten Bereich lag, zeigte sich für Medien mit verringertem Proteingehalt, dass mit zunehmender C_{DPT} die ermittelte PPB abnahm. Es zeigte sich weiterhin, dass für Matrices mit 15 % und 20 % Biseko®/PBS eine Aufschlüsselung im Konzentrationsbereich von $C_{DPT} < 110 \text{ mg/L}$ erforderlich gewesen wäre, um eine bessere Vergleichbarkeit der PPB – Werte in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Matrices zu ermöglichen.

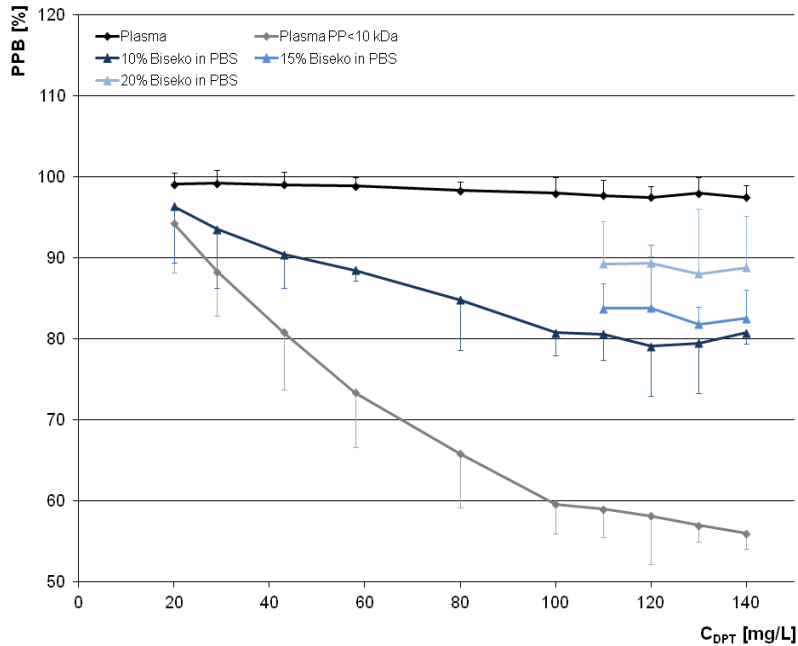


Abb. 24: Mittels UF (10 kDa Nanosep-Filtern) bestimmte PPB von DPT (C = 20 – 140 mg/L) in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Matrix, aus Übersichtlichkeitsgründen wurden jeweils die MW + oder – STABW angegeben, n=3.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der mittels UF erzielten Extraktionsausbeuten (EA) von DPT wurden für C_{DPT} von 110 -140 mg/L die prozentualen Differenzen zwischen den einzelnen Werten ($\Delta EA_1/EA_2$, z.B. zwischen 10 % und 15 % Biseko®/PBS) gebildet (Tab. 12).

	C _{DPT} [mg/L]			
	110	120	130	140
	$\Delta EA_1/EA_2$ (%)	$\Delta EA_1/EA_2$ (%)	$\Delta EA_1/EA_2$ (%)	$\Delta EA_1/EA_2$ (%)
10% Biseko®	-3,8	-5,7	-2,8	-2,1
15% Biseko®	-6,2	-6,3	-7,0	-7,1
20% Biseko®	-8,6	-8,3	-10,3	-8,9
Plasma				

Tab. 12: Zusammenstellung der berechneten Unterschiede zwischen den Extraktionsausbeuten in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Adsorptionslösung; erzielt durch UF.

Es zeigte sich, dass eine schrittweise Erhöhung des Proteingehaltes um 5 % zu einer Verringerung der Extraktionsausbeute um ~3 % führte, während die berechneten PPB um ~4 % anstiegen (Abb. 24).

Betrachtungen zur Abhängigkeit der PPB von $2x C_{\max}$ an DPT vom Proteingehalt der Matrix ergaben einen degressiv ansteigenden Verlauf für die PPB (Abb. 25). Aufgrund der fehlenden Datenpunkte im Bereich von 30 – 90 % Proteinanteil in der Lösung ergeben sich theoretisch zwei mögliche Kurvenverläufe, wobei der in „orange“ dargestellte Verlauf als wahrscheinlicher anzusehen ist.

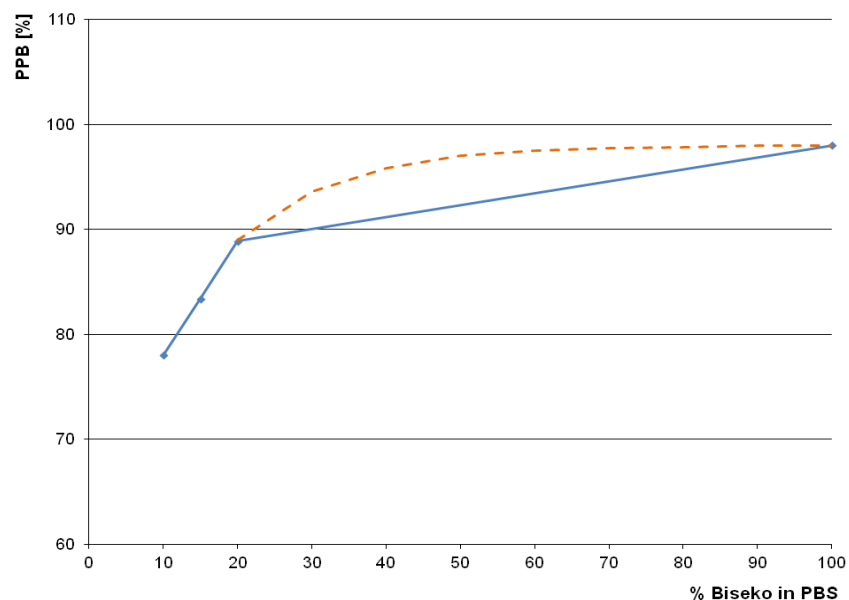


Abb. 25: Zwei mögliche Verläufe der mittels UF erzielten PPB für $2x C_{\max}$ an DPT (120 mg/L) in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Matrix.

Für LVX und CLI wurden aus den in den Untersuchungen hauptsächlich verwendeten Matrices wie Heparin-Plasma und 10 % Biseko®/PBS ebenfalls die PPB bestimmt. Es ergaben sich für LVX über den gewählten Konzentrationsbereich ($C = 0,1 - 2,0$ mg/L) 44 – 50 % PPB in Plasma und ~33 % PPB in 10 % Biseko®/PBS. Für CLI ($C = 1,75 - 12,0$ mg/L) resultierten PPB-Werte von 90 – 93 % (Plasma) und 37 – 59 % (10 % Biseko®/PBS).

5 Diskussion

5.1 Methodenentwicklung und –validierung zur quantitativen Bestimmung von DPT

Bei der Methodenentwicklung für die quantitative Bestimmung von Arzneistoffen stellt sich oftmals die Frage, ob der analytische Schwerpunkt auf der chromatographischen Auflösung und/oder einem hohen Durchsatz gelegt werden soll.

Zwei flüssigchromatographische Methoden sowohl mit photometrischer als auch massenspektrometrischer Detektion zur quantitativen Bestimmung von DPT aus bioanalytisch relevanten Matrices wurden entwickelt und nach internationalen Richtlinien¹⁶¹⁻¹⁶³ validiert. Dabei wurden zwei unterschiedliche HPLC-Säulen eingesetzt: Die Nucleosil® C8 HD – Säule ($t_{R_DPT} = 11,2$ min) führte zur verbesserten chromatographischen Abtrennung von DPT gegenüber matrixbedingten Störsignalen, insbesondere wenn komplexe biologische Matrices wie Plasmen und Detektoren mit niedrigen Selektivitäten (UV-Photometer) eingesetzt wurden. Andererseits bot die Luna® C8 HD – Säule ($t_{R_DPT} = 4,9$ min) eine besser geeignete Alternative, wenn hohe Probenaufkommen (*High Throughput*) und/oder geringer belastete Matrices (Serum) gegeben sind bzw. MS-Detektion möglich ist.

Die Retentionszeiten beider HPLC-Methoden für DPT sind vergleichbar mit oder unterhalb der bisher schnellsten publizierten DPT-Methode aus Plasma ($t_{R_DPT} = 9,2$ min)¹⁷², die jedoch keinen internen Standard beinhaltete, der bei der chromatographischen Trennung berücksichtigt werden musste. Andere Methoden mit ähnlichen oder niedrigeren Retentionszeiten wurden nur für Serum getestet^{170, 173}, welches weniger potentielle Interferenzen enthält als Plasma, oder erfordern den Einsatz von UPLC¹⁷⁴, welche zwar als neue „*State-of-the-Art*“ - Technik zunehmend an Bedeutung gewinnt, aber noch nicht in jedem Routinelabor verfügbar ist.

Die ermittelten LLOQ für DPT von 1,0 mg/L (UV) und 0,02 mg/L (MS) lagen unter den Grenzwerten von bisher publizierten Methoden, welche in einem Bereich von 2,0 – 3,5 mg/L^{168, 169, 172, 174} für die UV-Detektion und 0,1 – 1,6 mg/L¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ für die MS-Detektion lagen. Da für beide Methoden die Messpräzisionen und -richtigkeiten *intra diem*

und *inter dies* innerhalb der akzeptierten Toleranzen von $\pm 15\%$ ¹⁶¹⁻¹⁶³ lagen, ist davon auszugehen, dass die ermittelten LLOQ, wie sie für die Anwendung von Blutspiegelüberwachungen ausreichend sind, durch weitere Modifikationen in der Probenaufarbeitung (Erhöhung des eingesetzten Probenvolumens und der Aufkonzentrierung von DPT durch Verringerung des Rekonstitutionsvolumens) sowie unter Verwendung von moderneren und empfindlicheren massenspektrometrischen Detektoren um Faktor 2-3 weiter gesenkt werden können.

Die C_{DPT} der Patientenproben (6,4 - 6,7 mg/L) lagen innerhalb des therapeutischen Konzentrationsbereiches (1,0 – 15,0 mg/L) und oberhalb der minimalen Inhibierungskonzentrationen (MIC_{90}) von in der Therapie mit DPT relevanten Keimen wie *Staphylococcus aureus* (0,5 mg/L), vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* (4,0 mg/L) oder *Clostridium difficile* (1,0 mg/L)¹²⁴. Daher lässt die antibakterielle Therapie mit DPT eine hohe Effektivität in der Bekämpfung entsprechender Keime erwarten.

Insofern konnte eine Methode zur Konzentrationsbestimmung von Daptomycin im Plasma entwickelt und validiert werden, die nicht nur für Forschungsfragen sondern auch für pharmakokinetische Therapieoptimierung im Routinebetrieb der Krankenversorgung verwendbar ist.

5.2 Einfluss ausgewählter Arzneistoffe auf spezifische Zellfunktionen von PMN

Die Möglichkeit von PMN gezielt zu Orten des infektiösen Geschehens zu wandern, macht sie attraktiv als Transportvehikel für Antibiotika¹⁷⁸. Die unterschiedlichen Antibiotika LVX, DPT und CLI wurden hinsichtlich ihrer Aufnahme in PMN und ihrer Einflüsse auf die spezifischen PMN-Funktionen Viabilität, Chemotaxis, Phagozytose sowie die Freisetzen anionischer, radikaler Sauerstoffspezies („Oxidative Burst“) und von Zytokinen untersucht. Da pharmako- und toxikodynamische Einflüsse eng mit der Arzneistoffkonzentration am Infektionsort verbunden sind und zellassozierte Arzneistoffkonzentrationen ($C_{\text{zellassoziert}}$) aufgrund von aktivem und passivem In- und Effluxprozessen deutlich von den Konzentrationen im Inkubationsmedium ($C_{\text{extrazellulär}}$)

variieren können^{2, 34, 160, 179-181}, wurden die pharmakodynamischen Parameter, wenn möglich, mit den $C_{\text{zellassoziert}}/C_{\text{extrazellulär}}$ – Verhältnissen korreliert.

In den Zellstudien wurden für die drei Arzneistoffe zunächst Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen zeit- und konzentrationsabhängigen Beeinflussung der Viabilität der PMN durchgeführt. Die ermittelte Lebendrate von PMN unter Arzneistoffinkubation über einen Zeitraum von 17 h betrug im Vergleich zu arzneistofffreien PMN-Lösungen mehr als 98 %. Diese Angabe ist jedoch insofern alleine nicht hinreichend, da berücksichtigt werden muss, dass die absolute Zellzahl nach 17 h um ~42 % reduziert war. Dieses Ergebnis wurde hauptsächlich durch die biologische Halbwertszeit der PMN von 24 bis 36 h bedingt¹¹. Danach sterben die PMN innerhalb von 72 h durch den Prozess der Apoptose^{10, 11} oder des programmierten Zelltodes¹².

Die Anreicherung von Fluorchinolonen in Zellen (PMN, THP1-Monocyten, Makrophagen, HL-60-Zellen, Epithelzellen, Kulturgewebszellen) und Geweben (Pankreas, Liquor cerebrospinalis) wurde bereits früher beschrieben^{33, 34, 36, 38, 44-51}. Allerdings gibt es bis heute kaum Untersuchungen zur zellassozierten Aufnahme von LVX in PMN und dessen Wirkung auf mehrere spezifische Zellfunktionen. In einer der wenigen Arbeiten beschäftigte sich Mandell⁴⁴ mit der intrazellulären Aufnahme von LVX und dessen Einfluss auf die Chemotaxis.

In den hier durchgeführten Untersuchungen zur Aufnahme von LVX durch PMN zeigte sich, dass sich für kleinere C_{LVX} (0,5 - 1,0x C_{max}) eine konzentrationsabhängige Anreicherung andeutete, jedoch für höhere C_{LVX} (2x C_{max}) es zu keiner weiteren Steigerung der zellassozierten Akkumulation kam, was durch Arbeiten von Taira⁴⁹ und Vazifeh⁵⁰ ebenfalls belegt wurde. Dabei zeigte sich für LVX die Besonderheit, dass die zellassozierte Aufnahme schnell innerhalb der ersten 5 min erfolgte und bereits nach 30 min eine „*Steady State*“-Konzentration erreicht wurde. Eine darüber hinaus verlängerte Inkubationszeit führte nicht zu einer weiteren Erhöhung der zellulären Aufnahme von LVX. Diese intrazelluläre Pharmakokinetik lässt sich dadurch erklären, dass die zelluläre Anreicherung von Fluorchinolonen durch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen dem

Influx, der intrazellulären Bindung an bisher nicht definierte Bestandteile und dem Efflux bestimmt wird, wobei die einzelnen Faktoren zwischen den unterschiedlichen Fluorchinolonen variieren können⁴⁵. Die schnelle Aufnahme von LVX wird nach Literaturangaben aktiv sowohl durch die Proteinkinase C (PKC) als auch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) ermöglicht^{34, 38}. Für andere Zelltypen (Caco-2 Zellen) wurden zusätzlich bereits aktive Transporter (OATP1A2) für den Influx von LVX beschrieben¹⁸². Vazifeh⁵⁰ diskutiert hingegen das Auftreten einer passiven Aufnahme und Anreicherung von LVX in PMN, wobei die extrazellulären Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Aufnahme von LVX in PMN haben sollen, da das Zwitterion LVX für den Eintritt in das Zellzytosol Kationenkanäle benutze und durch die Kationen komplexiert würde, was wiederum zu einer gesenkten freien Diffusion von LVX führe. Änderungen in der strukturellen Konformation von LVX und in der Lipophilie der Zellmembranen können darüber hinaus ebenfalls zur passiven Anreicherung von LVX in PMN beitragen⁵⁰. Der Efflux von Fluorchinolonen erfolgt schnell innerhalb weniger Minuten^{34, 38}. Der aktive Efflux von LVX aus den PMN wird über ATP-Bindungskaskade (ABC)-Transporter wie das P-Glykoprotein oder das „Multiple Resistance Protein“ (MRP) vermittelt^{45, 179}. Darüber hinaus werden Unterschiede in der zellulären Aufnahme verschiedener Fluorchinolone durch diverse Transportgleichgewichte bedingt, welche u.a. von den Substituenten in den Molekülstrukturen der Fluorchinolone^{183, 184} und den spezifischen Zelltypen^{34, 38} abhängig sind. Nach 30 min kam es zu einer Gleichgewichtseinstellung zwischen dem In- und Efflux von LVX, was sich in der Ausbildung von „*Steady State*“ – Konzentrationen widerspiegelte.

Betrachtungen der zellassoziierten C_{LVX} in PMN zeigten, dass für relevante Keime die Mindestinhibierungskonzentrationen (MIC_{90}) überschritten sind: 1,0 mg/L für *Streptococcus pneumoniae*, 2,0 mg/L für *Streptococcus bovis*, 0,5 mg/L für *Streptococcus pyogenes* und *Staphylococcus aureus* sowie die MIC_{50} von 1,0 mg/L für *Enterococcus faecalis*¹⁸⁵. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse kann eine hohe Effektivität in der antibakteriellen Therapie dieser Keime mit LVX erwartet werden, insbesondere wenn die Keime durch die PMN phagozytiert und die PMN durch die Aufnahme von LVX nicht in ih-

ren Aufgaben beeinträchtigt werden.

Während die Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von LVX eine deutliche Akkumulation von LVX in PMN zeigten, lagen die $C_{\text{zellassoziiert}}/C_{\text{extrazellulär}}$ – Verhältnisse von DPT für die eingesetzten, therapeutisch relevanten Konzentrationen in einem Bereich von 0,55 bis 1,10. Van der Auwera⁴⁰ bestimmte mittels eines mikrobiologischen Assays intrazelluläre Konzentrationen an DPT in polymorphkernigen Leukozyten, die 60 % der extrazellulären Konzentrationen entsprachen. Diese Werte sind vergleichbar mit den in unseren Untersuchungen gefunden zellassoziierten Konzentrationen von 55 % bis 110 % des extrazellulären Konzentrationsniveaus.

Der jetzige Wissensstand in der internationalen Fachliteratur^{124, 186-190} beschreibt den Wirkmechanismus von DPT in Gram-positiven Bakterien wie folgt: In Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen erfolgt, unter Konformationsänderung der DPT-Moleküle, ein Eindringen von DPT in und eine irreversible Bindung an die Zellmembran der Bakterien. Anschließend kommt es nach der Oligomerisierung der DPT-Moleküle zur Ausbildung von Poren oder Ionenkanälen, durch die ein Efflux von Kalium-Ionen (K^+) aus der Bakterienzelle erfolgt. Dieser Verlust an K^+ -Ionen führt zur Depolarisation der Bakterienmembran und zum Zusammenbruch des Membranpotentials, in dessen Folge es zum bakteriellen Zelltod kommt (Abb. 26).

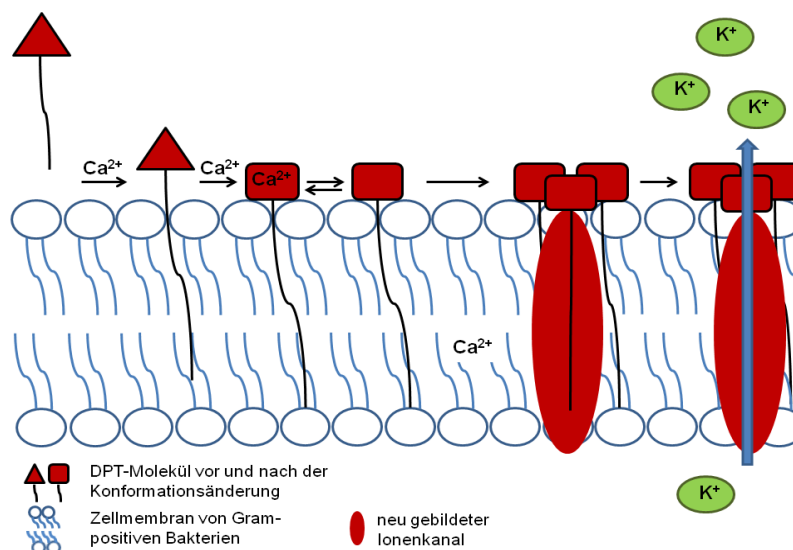


Abb. 26: Wirkmechanismus von DPT in Gram-positiven Bakterien^{124, 186-190}.

Allerdings ist bislang nicht vollständig geklärt, ob und in welchem Ausmaß DPT in PMN eindringen kann^{40, 191}. Die in den durchgeführten Untersuchungen erzielten Ergebnisse belegen, dass unter den Testbedingungen im Beobachtungszeitraum keine intrazelluläre Anreicherung von DPT in PMN stattfindet. Dies kann auch damit in Zusammenhang stehen, dass eine mögliche DPT-Aufnahme in PMN zusätzlich durch die hohe Bindung von DPT an Plasmaproteine (90 – 94 %)¹²¹ erschwert wird. Jedoch zeigten Betrachtungen der zellassozierten C_{DPT} in PMN (20 – 33 mg/L für $0,5 \times C_{max}$, 38 – 50 mg/L (C_{max}), 66 – 89 mg/L ($2 \times C_{max}$)), dass für relevante Keime die Mindestinhibierungskonzentrationen (MIC_{90}) deutlich überschritten sind: 0,13 mg/L für MRSA, 1,0 mg/L für vancomycin-resistente *Staphylococcus aureus*, 0,25 mg/L für methicillin-resistente *Staphylococcus epidermidis*, 0,25 mg/L für *Streptococcus pneumoniae*, 0,06 mg/L für *Streptococcus pyogenes*, 4,0 mg/L für *Enterococcus faecium* und 2,0 mg/L für *Enterococcus faecalis*^{121, 192}. Die MIC_{90} -Werte von DPT liegen unterhalb derer von Vancomycin und LNZ, zwei Antibiotika, die in der Behandlung von Infektionen mit vergleichbaren Keimen eingesetzt werden¹⁹² (Tab. 13), was eine höhere Effektivität durch DPT in der antibakteriellen Therapie dieser Keime erwarten lässt insbesondere wenn die Keime durch die PMN phagozytiert und die PMN durch die Aufnahme von DPT nicht in ihren Aufgaben (Chemotaxis, Phagozytose) beeinträchtigt werden.

Bakterium	MIC_{90} [mg/L]		
	DPT	Vancomycin	LNZ
methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>	0,13	1	4
methicillin-resistente <i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,25	1	4
<i>Enterococcus faecium</i>	4	64	4
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	64	4

Tab. 13: Gegenüberstellung der Mindestinhibierungskonzentrationen (MIC_{90}) für DPT, Vancomycin und LNZ hinsichtlich vier relevanter Bakterienarten^{121, 192}.

Für CLI konnte keine zellassozierte Aufnahme nachgewiesen werden, was zunächst im Gegensatz zu anderen Befunden^{160, 164} zu stehen scheint. Berücksichtigt man jedoch, dass bei den eingesetzten, therapeutisch relevanten Konzentrationen (1,75 - 7,00 mg/L) und einer Plasmaproteinbindung von ~94 %⁶³ die freien Konzentrationen 0,11 – 0,42 mg/L betragen, erklärt sich, dass eine zellassozierte Aufnahme von CLI mittels der

eingesetzten Bestimmungsmethode LC-UV (untere Erfassungsgrenze: 0,5 mg/L) nicht mehr ermittelbar war. Wäre es zu einer (deutlichen) zellulären Anreicherung von CLI in PMN gekommen, wären zellassoziierte Konzentrationen an CLI wohl messbar gewesen.

Um den Einfluss von Antibiotika auf das Migrationsverhalten von PMN zu untersuchen, wurden von LVX, DPT und CLI erhöhte Konzentrationen im supratherapeutischen Bereich ($2 \times C_{\max}$) eingesetzt. Bei den Untersuchungen überraschte, dass sowohl LVX als auch CLI zu einer nach einstündiger PMN-Inkubation signifikant gesteigerten und alle drei Antibiotika zu einer nach 5 h deutlich reduzierten Wanderungsrate der PMN in Richtung einer ZAS-haltigen Quelle führten, während das Migrationsverhalten in Richtung einer fMLP-haltigen Quelle nicht signifikant beeinflusst wurde. In der Literatur gibt es Hinweise, dass die Aktivierung von PMN sowohl durch fMLP als auch durch ZAS mit einem schnellen Efflux von Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytosol verbunden und somit das exogene Ca^{2+} für die maximale PMN-Wanderung entlang des Konzentrationsgradienten in einer Boyden-Kammer erforderlich ist¹⁹³⁻¹⁹⁷. Da der Rückstrom von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen aber in mit ZAS aktivierte PMN im Vergleich zu fMLP-aktivierten Neutrophilen verlangsamt ist¹⁹⁸, scheint sich ZAS initial deutlicher auf das Migrationsverhalten von PMN unter Antibiotika-Einfluss auszuwirken. Darüber hinaus ist in der Literatur beschrieben, dass die beiden Chemoattraktantien zusätzliche Aktivierungsmechanismen der Chemotaxis von Neutrophilen besitzen^{199, 200}, auf die für fMLP im Folgenden noch näher eingegangen wird. Im Fall von ZAS wird eine Beteiligung des *Toll-like* Rezeptor 2 (TLR2) in der Aktivierung des Immunabwehrprozesses diskutiert²⁰¹⁻²⁰³. Azuma et al.²⁴ fanden für Makrophagen von Ratten ebenfalls ein reduziertes Wanderungsverhalten in Richtung einer ZAS-haltigen Quelle, nachdem die Makrophagen mit LVX inkubiert wurden. Dabei ist zu bedenken, dass eine deutlich reduzierte Chemotaxis eine Beeinträchtigung der Abwehrleistung des Immunsystems gegenüber mikrobiellen Eindringlingen bedeuten kann²⁴.

Die Phagozytose von Erregern und Fremdstoffen sowie deren anschließende Freisetzung gegenüber anionischer und radikaler Sauerstoffspezies („Oxidative Burst“) gehören zu den Hauptmechanismen, mit denen die PMN den menschlichen Körper vor mikrobiellen

Eindringlingen schützen^{3, 156, 204}. Zu diesen durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase gebildeten Sauerstoffspezien zählen Superoxid-Anionen (O_2^-), Hydroxylradikale (OH^\bullet), Singlett-Sauerstoff (1O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), durch deren Freisetzung Phagozyten andere Organismen und Tumorzellen abtöten, aber auch schädigende Effekte auf den inflammatorischen Prozess hervorrufen können²⁰⁴⁻²⁰⁷. Der NADPH-Oxidase-Komplex ist ein Multiproteinsystem, das in den Zellen vorhanden ist, aber erst durch die Phagozytose von Fremdstoffen und Erregern aktiviert wird^{3, 204}. Neben den Sauerstoffspezien werden über die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS II) auch reaktive Stickstoffverbindungen wie das NO^\bullet gebildet^{8, 208}. Eine Kombination der beiden aktiven Verbindungsklassen ergibt ein ausgeprägtes Abtötungspotential gegenüber Erregern und Fremdstoffen⁷.

Die Phagozytose von FITC-*E.coli* durch PMN wurde unter dem Einfluss von LVX, DPT und CLI signifikant um bis zu -70 % reduziert. Das bedeutet, dass die mit den drei Antibiotika inkubierten PMN im Vergleich zu arzneistofffreien Kontrollen weniger FITC-*E.coli* je Zeiteinheit aufgenommen haben. Dabei erniedrigte sich das Phagozytosepotenzial der PMN innerhalb der ersten zwei Stunden signifikant, wobei keine Abhängigkeit gegenüber den eingesetzten Antibiotika-Konzentrationen festgestellt werden konnte. Da nach drei Stunden die Anzahl der inkorporierten FITC-*E.coli* je PMN wieder zunahm, ist von einer partiellen Erholung der Phagozytoseaktivität der PMN auszugehen. Es muss weiter berücksichtigt werden, dass durch eine bedingt stattgefundenene zellassozierte Aufnahme der Arzneistoffe und eine damit einhergehende Erschöpfung des Intrazellulärvolumens der PMN die Möglichkeit, weitere Fremdstoffe (z.B. FITC-*E.coli*) aufzunehmen, erniedrigt sein kann und erst nach dem „Verdau“ und Efflux der bereits aufgenommenen Fremdstoffe eine weitere, gesteigerte Aufnahme möglich ist. Azuma et al.²⁵ spekulierten außerdem, dass die Verminderung der Phagozytoseaktivität durch Fluorchinolone aufgrund einer unterdrückten Expression von Fc-Rezeptoren und/oder einer teilweisen Aktivierung der GTPasen der Rho-Gruppe in Makrophagen induziert werden kann. Generell weisen die Antibiotika LVX, DPT und CLI einen inhibitorischen Effekt auf das Phagozytosepotenzial von PMN gegenüber FITC-

E.coli auf, was alleine betrachtet, für die Therapie von *E.coli* durch diese drei Antibiotika nicht förderlich sein dürfte. Unter Berücksichtigung dieser Daten erscheint es als angemessen, in weiterführenden Untersuchungen die Zeitabhängigkeit der Phagozytose von FITC-*E.coli* durch PMN für Inkubationszeiten mit den Antibiotika von $t > 3$ h zu bestimmen, um eine Aussage darüber zu ermöglichen, ob eine Verminderung der Phagozytoserate nur initial bedingt ($t \leq 3$ h) oder von grundsätzlicher Natur ist. Darüber hinaus wäre es sicherlich auch interessant die Phagozytoseraten der oben genannten Keime, gegen die die untersuchten Antibiotika hauptsächlich klinisch eingesetzt werden, durch PMN zu ermitteln.

Da die Bildung und Freisetzung von anionischen, radikalen Sauerstoffspezies an die Aktivierung der NADPH-Oxidase gekoppelt ist^{204, 207}, wurden die Auswirkungen von LVX, DPT und CLI auf den „Oxidative Burst“ der PMN untersucht, indem die PMN mit drei unterschiedlichen Stimulantien inkubiert wurden: *E.coli* als phagozytierbare Partikel, das chemotaktische Peptid fMLP als schwaches und der Proteinkinase C Ligand PMA als starkes Stimulans¹⁵⁶. Während der „Oxidative Burst“ durch die PMN nach Stimulation mit *E.coli* oder fMLP keine signifikante Beeinflussung durch die drei Antibiotika aufwies, resultierte für PMA eine Unterdrückung des „Oxidative Bursts“ von bis zu -40 % für DPT-inkubierte PMN. Unterschiede in der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies sind dabei auch auf die verschiedenen Stimulationsmechanismen von *E.coli*, fMLP und PMA zurückzuführen²⁰⁹. So wird der oxidative Zellmetabolismus entweder über eine direkte (PMA) oder indirekte (über die Regulationswege der Phospholipasen A2 bzw. C; fMLP) Stimulierung der NADPH-Oxidase beeinflusst. Da darüber hinaus PMA ein PKC-Aktivator ist, besteht die Möglichkeit, dass das Hochregulieren eines zelleinwärts gerichteten Transportsystems, wie es für Ciprofloxacin und PMN diskutiert wird, einen entscheidenden Einfluss auf die Verminderung des oxidative Burst besitzt³⁶. Zusätzlich kann fMLP neutrophile Granulozyten stimulieren, indem es an selektive Membranrezeptoren (Formylpeptid-Rezeptor FPR, Formylpeptid-Rezeptor-like 1 FPRL1) der PMN bindet^{199, 210}. Im Gegensatz dazu ist die Stimulation mit *E.coli* ein Phagozytose-abhängiger Aktivierungsschritt^{156, 199, 211}. Das bedeutet, dass erst nach Inkorporation der

E.coli in die PMN eine Aktivierung der NADPH-Oxidase stattfindet, während für fMLP und PMA bereits eine Stimulation der PMN-Membran für die Aktivierung der NADPH-Oxidase und somit für die Bildung von anionischen, radikalen Sauerstoffspezien ausreichend ist²⁰⁴. Es wird in der internationalen Fachliteratur auch diskutiert, dass intakte Neutrophile nach Stimulation durch phagozytierbare Partikel, fMLP oder PMA einer Veränderung in der Ausbildung und Reorganisation von intrazellulären Zellkompartimenten unterliegen^{8, 212-214}. Der Einfluss dieser Veränderungen auf die Aktivierung der NADPH-Oxidase in den Phagozyten und somit auf die Bildung und Freisetzung von anionischen und radikalischen Sauerstoffspezien ist jedoch noch unklar⁸. Für CLI-inkubierte PMN resultierte darüber hinaus eine konzentrationsabhängige, signifikante Steigerung des „Oxidative Bursts“ nach 2 h und eine spätere Suppression nach 3 h. Zhao¹⁵⁶ diskutierte, dass bestimmte Arzneistoffe wie das Anästhetikum Propofol, speziell wenn sie mit langkettigen Triglyzeriden versetzt sind, die Membranaktivität der NADPH-Oxidase beeinflussen, was wiederum eine verzögerte Bildung von NADPH-Oxidase und somit die spätere Suppression der Freisetzung radikaler Sauerstoffspezies zur Folge haben kann. Es bliebe zu prüfen, inwieweit eine derartige Beeinflussung durch CLI ebenfalls hervorgerufen wird.

In weiteren Untersuchungen konnte interessanter Weise gezeigt werden, dass LVX, DPT und CLI *in vitro* die Freisetzung von Zytokinen wie IL-1 β und IL-8 beeinflussten. Darüber hinaus ergaben sich Beeinträchtigungen der IL-6 Freisetzungen durch LVX und DPT, während die Sekretionen anderer Interleukine wie IL-2, IL-10, IL-12 p70 und TNF- α nicht beeinträchtigt wurden. Pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α gelten im menschlichen Körper als wichtige Vermittler in der immunchemischen Abwehr von Krankheitserregern und Infektionen. Diese Zytokine sind in der Lage, PMN anzulocken, welche wiederum in den Prozess der Phagozytose und der Zerstörung von bakteriellen Xenobiotika involviert sind²¹.

Der Einfluss von Antibiotika auf spezifische Zellfunktionen ist dabei davon abhängig, welche Untersuchungsmethoden eingesetzt wurden^{23, 156}. Viele Zytokine werden von mehr als einer Zellenart gebildet, aber nicht jede Zelle setzt die gleichen Zytokine frei. Daher ist der Effekt von Arzneistoffen (z.B. Fluorchinolonen) auf die Zytokinsekretion nicht

einheitlich, sondern variiert in Abhängigkeit vom Zelltyp und den betrachteten Zytokinen²³. So zeigte LVX eine moderat erniedrigte Sekretion (bis zu -20 %) von IL-1 β , IL-6 und IL-8, was prinzipiell durch Arbeiten von Baltch¹³ und Dalhoff^{17, 23} mit primär monozytischen Zellen belegt werden konnte, in denen Fluorchinolone *in vitro* und *in vivo* die Entstehung von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α teilweise unterdrückten. Für eine Inhibierung der Freisetzung von TNF- α waren jedoch C_{LVX} von ≥ 100 mg/L erforderlich¹⁷, die somit deutlich über den eingesetzten C_{LVX} in unseren Untersuchungen lagen, was die fehlende Beeinflussung der Sekretion von TNF- α erklären kann. In den Arbeiten von Dalhoff^{17, 23} zeigte sich außerdem, dass LVX ($C \geq 10$ mg/L) die Sekretion von IL-2 in Monozyten in einer konzentrationsabhängigen Weise erhöhte, während durch die humanen PMN keine Änderung in der IL-2 Freisetzung festgestellt werden konnte.

Während in den Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass DPT eine signifikante, konzentrationsabhängige Verminderung (-70 %) in der Freisetzung der Interleukine IL-1 β , IL-6 und IL-8 durch isolierte humane PMN hervorrief, postulierten Thallinger et al.²¹⁵ in einer der wenigen Arbeiten zum Einfluss von DPT auf die Zytokinsekretionen, dass DPT ($C = 40$ mg/L) nach vierstündiger Inkubationszeit keinen Einfluss ausübe. Es ist sicherlich erforderlich, zwei grundlegende Tatsachen für einen direkten Vergleich zu berücksichtigen: Zum einen die Inkubationszeit der Zellen mit DPT (4 h versus 18 h) und zum anderen die Art des Inkubationsmediums (Vollblut versus proteinhaltige Phosphatpufferlösung). Theoretisch besteht durchaus die Möglichkeit, dass sich der Einfluss von DPT auf die Zytokinsekretion aufgrund von zellulären Prozessen (zellulärer Stress) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer verändert. Grundsätzlich ist ein Vergleich zwischen den einzelnen, in der Literatur beschriebenen Werten aufgrund unterschiedlicher Techniken und Parameter (ELISA oder PCR, Blut oder isolierte Zellen, PMNs oder Monozyten, experimentelle Bedingungen) schwierig²¹. Weiterhin bliebe zu beachten, dass der Einsatz von Vollblut anstatt von isolierten Blutzellen sicherlich eine realistischere Situation widerspiegelt^{13, 215}. Soll jedoch der Einfluss eines Arzneistoffes auf einen bestimmten Zelltypen betrachtet werden, so stellt die Variante der isolierten Zellen häufig die einzige Möglichkeit der Durchführung dar.

Im Fall von CLI-inkubierten PMN und deren konzentrationsabhängige, signifikante Stimulation (+70 %) der IL-8 Freisetzung ist eine weitere Besonderheit zu beachten. IL-8 ist ein endogenes Chemoattraktans, welches in der Lage ist, die Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen zu erhöhen²⁴. Eine gesteigerte Freisetzung von IL-8 nach Inkubation der PMN mit CLI kann somit zu einem erhöhten Wanderungsverhalten der PMN führen, was in der antibakteriellen Therapie durchaus von Vorteil sein kann. IL-8 wurde in den durchgeführten Untersuchungen nicht als Chemoattraktans verwendet, so dass eine direkte Aussage über das Migrationsverhalten von CLI-inkubierten PMN jedoch nicht möglich ist. Dies bliebe in weiteren Untersuchungen zu prüfen.

Viele der lokal freigesetzten Interleukine initiieren eine überschwellige Reaktion des Immunsystems, welche bis zu einer Art metabolischer Entgleisung führen kann, da der Körper die Kontrolle über seine eigenen inflammatorischen und anti-inflammatorischen Regulationsmechanismen verliert²¹⁵. Wenn die Balance nicht wieder hergestellt werden kann, besteht die Möglichkeit, dass entweder ein systematisches Entzündungssyndrom oder ein überkompensierendes anti-inflammatorisches Syndrom auftritt. Da beispielsweise IL-6 sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt, deren Ausmaß vom Stadium der Entzündung abhängig ist, kann der klinische Einfluss einer Reduktion von freigesetzten pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, TNF- α) oder einer gesteigerten Sekretion an anti-inflammatorischen Interleukinen auf Proteinebene oder molekularer Ebene sich während eines entzündlichen Geschehens ändern²¹⁵.

Die Beeinflussungen der Chemotaxis, der Phagozytoseaktivität, des „Oxidative Bursts“ und der Freisetzung der Zytokine durch die Antibiotika LVX, DPT und CLI zeigen, dass die drei Arzneistoffe sowohl in stimulierende als auch beeinträchtigende Interaktionen mit den PMN *in vitro* treten²⁴. In Anbetracht der offensichtlich fehlenden Akkumulation von DPT und CLI in PMN, unterstreicht dies die Annahme, dass die Aktivität eines Antibiotikums nicht direkt von dessen zellulärer Anreicherung hergeleitet werden kann²¹⁶,²¹⁷. Jedoch bleibt insgesamt zu berücksichtigen, dass die Untersuchungen mit isolierten

Zellen durchgeführt wurden und wie schon Thallinger et al.²¹⁵ zeigten, ist ein Unterschied in den Auswirkungen durch DPT gegenüber Vollblutproben nicht von der Hand zu weisen. Es bleibt offen, inwieweit sich die festgestellten Beeinflussungen der Antibiotika *in vivo* bestätigen ließen oder ob der menschliche Körper über Regulationswege verfügt, die die beobachteten Einflüsse verstärken, reduzieren oder verhindern können.

5.3 Festphasenmikroextraktion (SPME) von Arzneistoffen

Nach Literaturangaben hängen die SPME – Ausbeuten der Fasern für Arzneistoffe und andere Verbindungen von unterschiedlichen Parametern ab, zu denen unter anderem die Extraktionszeiten, die Salzkonzentration, der Agitationsmodus und der pH – Wert der Adsorptionslösung zählen^{98, 110-115}. In den durchgeführten Untersuchungen zum Extraktionsverhalten different beschichteter Sonden für die SPME von DPT, LNZ, LVX und SRL zeigte sich, dass neben den Extraktionszeiten und dem Agitationsmodus insbesondere die Wahl der Faserbeschichtungen einen deutlichen Einfluss auf die Extraktionsausbeuten aufwies^{98, 102, 218}.

Im Gegensatz zu zahlreichen Publikationen^{104, 115, 219-222}, in denen eine schnelle Einstellung des Extraktionsgleichgewichtes innerhalb weniger Minuten postuliert wurde, zeigten die Untersuchungen, dass für die SPME von C_{\max} an DPT und LVX mindestens eine Adsorptionszeit von 40 min, in vielen Fällen sogar von mehr als 60 min, erforderlich war, bevor die SPME – Fasern in den Extraktionsausbeuten ein Sättigungsverhalten aufwiesen. Vergleichbare Ergebnisse wurden in anderen Arbeiten für das Antiepileptikum Carbamazepin¹¹⁴ und phenolische Verbindungen²²³ erzielt. Für die SPME von SRL aus Vollblut deuteten sich zur Erreichung eines Extraktionssättigungsverhaltens ebenfalls Adsorptionszeiten von über 24 min an. Die Unterschiede in den einzelnen, maximal erforderlichen Adsorptionszeiten lassen dabei den Schluss zu, dass die Länge der Adsorptionszeit durch zwei grundlegende Parameter mitbestimmt wird: Die Wahl der Faserbeschichtung sowie die chemischen Strukturen und Eigenschaften der zu extrahierenden Analyten, was im Folgenden noch detaillierter diskutiert wird. Die Bestimmung der maximal notwendigen Adsorptionszeiten ist von Bedeutung, da bei

einem Nichterreichen des Sättigungszustandes geringe Zeitunterschiede in den Adsorptionszeiten einen deutlichen Einfluss auf das Ausmaß und die Reproduzierbarkeit der Extraktionsausbeuten besitzen können (Abb. 27). Analog verhielt es sich für die Desorptionszeiten, die, wie am Beispiel von DPT gezeigt werden konnte, für das Erreichen der maximalen Extraktionsausbeuten an DPT ebenfalls über 45 min betrug. Eine, unter Berücksichtigung der Standardabweichungsbereiche der erzielten Extraktionsausbeuten, um 5 % reduzierte kalkulierte Extraktionsausbeute würde immer noch Desorptionszeiten von ~30 min erfordern.

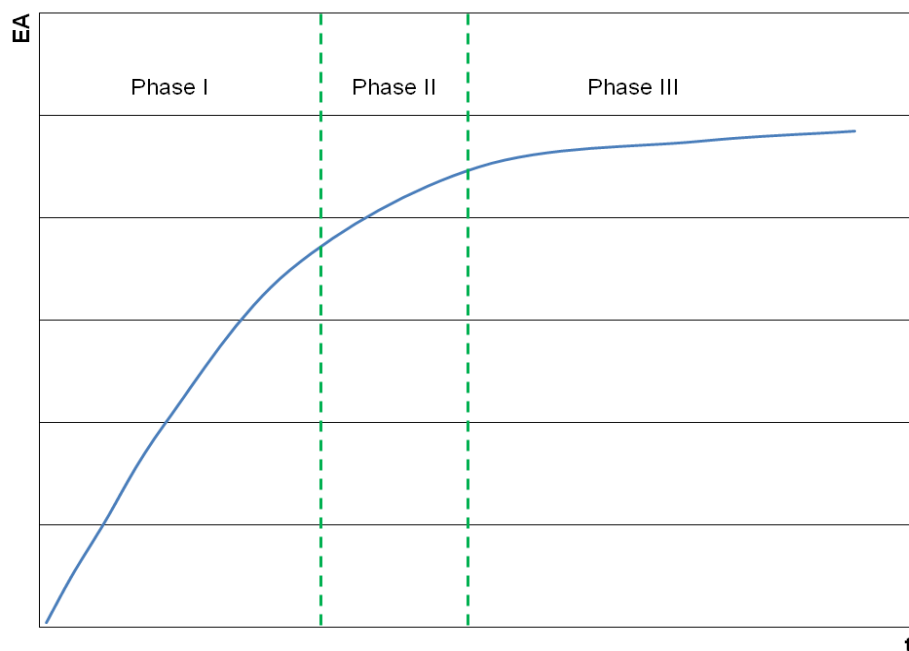


Abb. 27: Schematische Darstellung der Extraktionsausbeuten (EA) in Abhängigkeit von der Adsorptionszeit (t): Phase I spiegelt den Bereich wieder, in dem Abweichungen von der Adsorptionszeit einen deutlichen Einfluss auf die EA besitzen, in Phase II und III sinkt der Einfluss bis in Phase III geringe Zeitabweichungen keine deutlichen Unterschiede in den EA bewirken²²⁴.

Die Extraktionsausbeuten von PPy-beschichteten Fasern für LNZ stiegen in Abhängigkeit von der Dicke und Länge der Polymerbeschichtung. Während zwischen der Beschichtungslänge und der extrahierten Masse an LNZ ein linearer Zusammenhang besteht ($R^2 = 0,942$), scheint der Einfluss der Beschichtungsstärke durch gleichzeitige Veränderungen in der porösen Mikrostruktur hervorgerufen zu werden⁹⁸. Eine Abhängigkeit der extrahierten Analytmenge von den Beschichtungsstärken der Fasern

haben auch Vuckovic et al.¹¹⁴ festgestellt, indem sie Carbamazepin mit vier unterschiedlich dicken (15 – 60 μm) und mit C18-beschichteten SPME – Fasern inkubiert haben. Theoretisch betrachtet ist das erklärbar, da V_f (Volumen der Faser) als Teil des Dividenden (Gleichung 1) eine direkte Proportionalität zur extrahierten Analytmenge (n) besitzt. Vuckovic et al.¹¹⁴ fanden darüber hinaus, dass mit zunehmender Beschichtungsdicke der Fasern die Zeit zum Erreichen des Extraktionsgleichgewichtes zunahm, da die Analyten länger benötigen, um in die dickeren Beschichtungen zu diffundieren, was aber für pharmakokinetische Fragestellungen, bei denen eine enge zeitliche Auflösung entscheidend ist, hinderlich sein kann. Ein Vorteil von dickeren Faserbeschichtungen ist eine verringerte Variabilität in den Extraktionsausbeuten zwischen den einzelnen Fasern, was unter anderem durch eine einfachere automatisierte Herstellung ermöglicht wird¹¹⁴.

Im Hinblick auf die Anwendung der SPME in der routinemäßigen Analytik wurde die Extraktion von LNZ aus Plasma, das unterschiedlich antikoaguliert (Natriumzitrat, Heparin, EDTA) war, untersucht, wobei bei einem physiologischen pH – Wert von $\sim 7,4$ keine signifikanten Unterschiede in den Extraktionsausbeuten für LNZ zwischen Natriumzitrat und Heparin feststellbar waren⁹⁸. Für höhere pH – Werte (8,5), wie sie sich nach Antikoagulation mit Natriumzitrat ausbilden, deutete sich eine Steigerung der extrahierten Masse an LNZ um $\sim 20\%$ an, wodurch Natriumzitrat-Plasma für die *in vitro* – SPME von LNZ vorteilhafter erscheint. Die durch den pH – Wert hervorgerufenen Unterschiede in den Extraktionsausbeuten werden unter anderem durch elektrostatische Abstoßung zwischen den LNZ – Molekülen und den PPy – Ketten, welche beide bei niedrigeren pH – Werten einen protonierten und damit kationischen Ladungszustand bevorzugen, bedingt⁹⁸. Der Einsatz der SPME aus Heparin-antikoaguliertem Plasma kann im Vergleich zu Natriumzitrat-Plasma direkt, ohne vorherige Einstellung des pH – Wertes, bei einem physiologischen pH – Wert von $\sim 7,4$ erfolgen, ohne dass es zu einem merkbaren Verlust der Extraktionsausbeute an LNZ kommt. Dieses Ergebnis wird durch das Heparin, einem Glykosaminoglykan bestehend aus sulphatisierten Sacchariden, welche insgesamt einen anionischen Ladungszustand aufweisen, hervorgerufen. Durch

diesen anionischen Ladungszustand kann es zu einer teilweisen Kompensation des positiven elektrostatischen Feldes der PPy – Ketten kommen⁹⁸. Der Einsatz von EDTA-antikoaguliertem Plasma führte hingegen zur deutlichen Reduktion der Extraktionsausbeuten an LNZ gegenüber Natriumzitrats- und Heparin-Plasma. Szultka et al.⁹⁸ diskutierten als dafür ursächlich den vierzähligen Charakter des Tetracarboxylates bei pH – Werten von >7 , welcher zu einem elektrostatischen Umschließen der Ammoniumgruppen sowohl des LNZ als auch der PPy – Ketten führte. Dadurch resultierte eine Hinderung in den selektiven Wechselwirkungen zwischen LNZ und PPy und in deren Folge eine deutlich verringerte Extraktionsausbeute an LNZ. Im Gegensatz zu den mit LNZ erzielten Ergebnissen zeigte sich für SRL eine verbesserte Extraktion aus EDTA-antikoaguliertem Vollblut im Vergleich zu Vollblut, das mit Heparin antikoaguliert war. Dieses Ergebnis besitzt eine große Bedeutung, da mit EDTA antikoaguliertes Vollblut für das TDM von SRL eingesetzt wird und somit eine Übertragbarkeit der SPME in die Routineanalytik erleichtert würde¹⁵². Für eine mit EDTA antikoagulierte Blutprobe einer Patientin, für die in einer externen Bestimmung eine Konzentration an SRL von $24 \mu\text{g/L}$ ermittelt wurde, konnte insbesondere mit der PPy-beschichteten Faser eine vergleichbare Konzentration an SRL ($C_{\text{SRL}} = 27,7 \mu\text{g/L}$) erzielt werden. Dieses Ergebnis unterstreicht wiederum die prinzipielle Eignung der SPME für routinemäßige Analysen. Die für PTh- und PAN-C18-beschichtete Sonden erzielten Ergebnisse lagen deutlich unterhalb der extern bestimmten Konzentration an SRL und wichen somit auch von dem mit der PPy-beschichteten Faser ermittelten Ergebnis ab, was sich aber bereits in den Studien zur Adsorptionskinetik von SRL aus Vollblut andeutete (Abb. 14), bei der deutliche Unterschiede zwischen den Extraktionsausbeuten der einzelnen Faserbeschichtungen feststellbar waren.

Der Extraktion von SRL mittels HLM – Modell, das ansatzweise eine *in vivo* – SPME (physiologische Fließgeschwindigkeit des Blutes) simuliert, konnte gezeigt werden, dass die extrahierten Konzentrationen an SRL für PPy-beschichtete SPME – Fasern in einem Bereich liegen, der durch publizierte Arbeiten von Yanez et al.¹⁵⁰ und Yatscoff et al.¹⁵¹ umschrieben wird (Abb. 28). Die Differenzen in den theoretisch freien SRL-

Konzentrationen zwischen diesen beiden Publikationen begründen sich in leichten Schwankungen der PPB von SRL, die beide Arbeiten aber mit >90 % angeben. Auch für zuvor unbenutzte PTh-beschichtete Fasern ergaben sich zu Yatscoff et al.¹⁵¹ vergleichbare Größenordnungen für die freien Konzentrationen an SRL. Diese Ergebnisse implizieren, dass trotz des sehr geringen freien Anteils an SRL im Vollblut (0,18 %)¹⁵¹ unter Verwendung der PPy – Fasern hohe Extraktionsausbeuten (80 – 114 %) an SRL erzielt werden konnten.

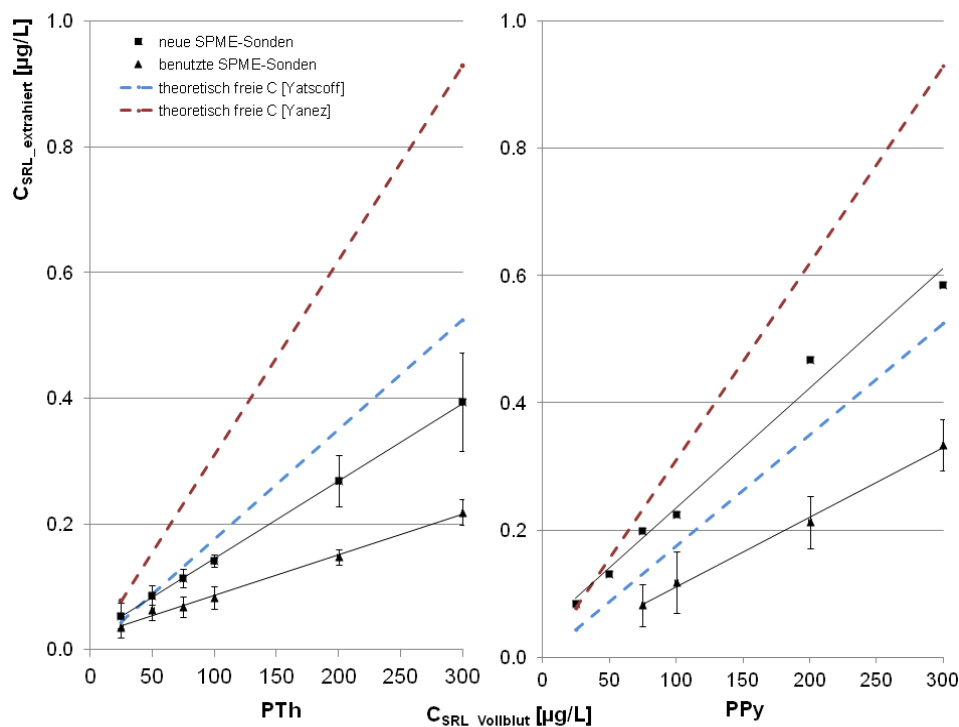


Abb. 28: Gegenüberstellung der mittels PTh- und PPy-beschichteten SPME – Fasern extrahierten freien C_{SRL} und Vergleich mit den theoretisch freien C_{SRL} ^{150, 151}.

Auch für die SPME von LNZ und DPT zeigte sich, dass PPy-beschichtete Sonden denen mit einer Beschichtung aus PTh überlegen waren. Während für LNZ und SRL unter Verwendung beider SPME – Fasertypen lineare Zusammenhänge zwischen den eingesetzten und extrahierten Konzentrationen bestanden, zeigte sich für DPT mittels PPy-beschichteten Sonden ein degressiv ansteigendes Extraktionsverhalten in Abhängigkeit von der Konzentration an DPT (Abb. 19). Szultka et al.⁹⁸ diskutierten als ursächlich das Auftreten einer Extraktionssättigung für Konzentrationen im höheren therapeutischen Bereich ($C_{DPT} > 20 \text{ mg/L}$). Die mittels HLM durchgeführten

Untersuchungen zeigen die Anwendbarkeit der SPME für LNZ, DPT und SRL teilweise bis in den therapeutischen Bereich, wobei aber Unterschiede aufgrund der eingesetzten Polymerbeschichtungen der Fasern auftraten^{98, 102}. Wie aus Abbildung 28 ebenfalls ersichtlich ist, treten teilweise deutliche Unterschiede zwischen zuvor unbenutzten und bereits benutzten SPME – Fasern für die Extraktion aus Vollblut auf. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den aus Plasmen erzielten Ergebnissen, für die die einzelnen Fasern mehrfach ohne deutlichen Leistungsverlust verwendet werden konnten, was auch in Arbeiten anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte^{96, 100, 101, 218, 225, 226}.

Unterschiede in den Extraktionsausbeuten für die einzelnen Analyten werden grundsätzlich auch durch die Interaktionsfähigkeit der Analyten mit den Polymerbeschichtungen hervorgerufen, wobei unter anderem π - π -Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und sterische Effekte die Extraktionsausbeuten beeinflussen^{98, 119, 227}. Während LNZ durch die freien Elektronenpaare am Stickstoff und Sauerstoff fast durchkonjugiert ist⁹⁸, besitzt LVX mit seiner sauren Carboxylgruppe und den basischen Stickstoff am Piperazinring^{219, 228} eher die Tendenz zur Protonierung oder Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Letzteres sowie π - π -Wechselwirkungen können insbesondere für die Extraktionsausbeuten zwischen LVX und der PEDOT-Beschichtung²²⁹ ursächlich sein. Dem gegenüber scheinen die Wechselwirkungen von DPT mit den einzelnen Faserbeschichtungen aufgrund der Molekülgröße des DPT hauptsächlich auf permanente und induzierte Dipole sowie Dispersionskräfte zu beruhen⁹⁸. Mit berücksichtigt werden müssen auch die unterschiedlichen PPB der einzelnen Arzneistoffe und die Bindungsstärken zwischen den Analyten und den Proteinen in biologischen Matrices, da es bei schwachen Arzneistoff-Protein-Bindungen zu Verschiebungen der Gleichgewichte in Richtung einer erhöhten Adsorption an die SPME – Faser kommen könnte, wodurch eine Anreicherung des Analyten an der Polymerbeschichtung resultieren würde⁹⁸. Während PEDOT bevorzugt π - π -Wechselwirkungen ausbildet²²⁹, neigen PAN-C18-Beschichtungen aufgrund der stark polaren Nitrilgruppen zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in wässrigen Matrices oder mit entsprechenden Analyten²³⁰. Boyaci et al.²³¹ diskutierten, dass eine

C18-Beschichtung insbesondere für die neutralen Formen der Analyte hohe Extraktionsausbeuten erzielte. Säuren Analyten wurden durch Protonierungen in eine neutrale Form gebracht, wodurch höhere Extraktionsausbeuten mittels C18-beschichteten Fasern erzielt werden konnten. Untersuchungen zum Einsatz different beschichteter SPME – Fasern für die Extraktion unterschiedlicher Analyten wurden auch von Boyaci et al.²³¹, Garcia-Esteban et al.²³² und Lorenzo²³³ durchgeführt. Dabei zeigte sich auch, dass gleiche Polaritäten zwischen den Faserbeschichtungen und den zu extrahierenden Analyten zu gesteigerten Extraktionsausbeuten führten²³².

Am Beispiel der SPME von SRL mittels PTh-beschichteten Fasern zeigte sich, dass deutliche Unterschiede in den Bewegungsmodi (schütteln, rühren, fließend) einen Einfluss auf die Extraktionsausbeuten der Fasern haben können. Im Gegensatz dazu resultierten aus Variationen in den Geschwindigkeiten eines Modus keine deutlichen Veränderungen in den Extraktionsausbeuten von PPy- und PTh-beschichteten Fasern für LNZ und DPT, was unter Verwendung des HLM-Modells verifiziert werden konnte^{98, 102}. Die Ergebnisse sind vergleichbar zu bereits publizierten Arbeiten^{103, 107, 223, 234}, in denen ebenfalls keine oder nur eine geringe Abhängigkeit der Extraktionsausbeuten von der Bewegungsgeschwindigkeit festgestellt werden konnte. Dieser Fakt ist deshalb von großer Bedeutung, da der Blutfluss in den einzelnen Gefäßregionen des menschlichen Körpers durchaus variieren kann⁹⁸ und es somit bei einer bestehenden Flussabhängigkeit zu abweichenden Extraktionsausbeuten kommen würde.

Der Zusatz eines neutralen Salzes wie Natriumchlorid führte nur zu einer sehr geringen Beeinflussung der Extraktionsausbeute, welche wohl hauptsächlich durch leichte Änderungen des Verteilungskoeffizienten zwischen der festen und der flüssigen Phase hervorgerufen wurde. Dieses Ergebnis war durchaus zu erwarten, da es keine ausgeprägten Wechselwirkungen der Natrium- und Chloridionen mit LNZ und PPy gibt, die den Adsorptionsmechanismus beeinflussen könnten⁹⁸. Ein Zusatz von Salz ist jedoch dann angezeigt, wenn es sich um polare oder flüchtige Verbindungen handelt, insbesondere in der Spurenanalytik, da durch den Salzzusatz die Extraktionsfähigkeit der Verbindungen erhöht werden kann¹¹¹. So konnten Du et al.²²³ für die „headspace“ – SPME

mehrerer phenolischer Verbindungen zeigen, dass mit steigendem Natriumchloridgehalt ein deutlicher Anstieg in den erzielten Extraktionsausbeuten resultierte. Dieser Anstieg wurde primär durch Änderungen in der Ionenstärke der wässrigen Lösungen (pH –Wert 2) hervorgerufen, welche zu veränderten Löslichkeiten der organischen Verbindungen in Wasser führte²²³.

Die Art und das Ausmaß der Arzneistoff-Protein-Bindung beeinflusst die Verteilung, den Metabolismus, die Ausscheidung und Bioverfügbarkeit des Arzneistoffes im menschlichen Körper^{62, 64-66, 69}. Die mittels SPME extrahierte Analytmenge ist direkt proportional zur ungebundenen und pharmakologisch wirksamen Arzneistoffkonzentration, da nur der freie Arzneistoffanteil für die Extraktion zur Verfügung steht^{60, 235}. Im Gegensatz dazu liefern traditionelle bioanalytische Methoden wie die SPE, LLE oder Plasmaproteinfällung mit organischen Solventien (Acetonitril, Methanol), welche einen Schritt zur Zerstörung der Arzneistoff-Protein-Bindung enthalten, Ergebnisse, die der totalen Arzneistoffkonzentration in der Probe entsprechen. Damit ermöglichen diese traditionellen Methoden eine Information bezüglich der Dosis und einer potentiellen Toxizität des Arzneistoffes²³⁵. Sicherlich ist es möglich, bei einer bekannten PPB den Anteil der ungebundenen Arzneistofffraktion aus der totalen Arzneistoffkonzentration zu berechnen, allerdings werden dann variierende Proteinkonzentrationen infolge von Erkrankungen, kompetitiven Interaktionen zwischen mehreren Arzneistoffen und den Proteinen sowie interindividuelle Schwankungen der PPB nicht berücksichtigt^{86-90, 235}. Dieses Problem kann durch eine zweite Analyse zur Bestimmung der ungebundenen Arzneistofffraktion mittels Mikrodialyse oder UF gelöst werden, jedoch vermeidet die SPME diese Problematik insbesondere für hochgebundene Arzneistoffe mit einer PPB > 80 %²³⁵.

Die Anwendbarkeit der SPME für die indirekte Bestimmung von PPB zeigten auch die eigenen Untersuchungen²¹⁸, bei denen für unterschiedliche Konzentrationen an DPT die PPB ermittelt wurden. Ein Vergleich mit PPB – Werten für DPT, die mittels UF erzielt beziehungsweise in der internationalen Fachliteratur¹²¹ bereits publiziert wurden, zeigte, dass für die SPME die ermittelten PPB geringfügig erniedrigt und die mittels UF erzielten PPB etwas zu hoch scheinen²¹⁸ (Abb. 29). Es bleibt aber anzumerken, dass die in der

Literatur¹²¹ verwendeten Daten ebenfalls auf experimentelle Studien beruhen und der Einsatz von aus Vollblut gewonnenem Heparin-Plasma interindividuelle und tagesabhängige Streuungen in den PPB hervorrufen kann. Weiterhin ist aus Abbildung 29 erkennbar, dass, trotz unterschiedlicher Extraktionsleistungen der mit PPy-, PTh- und PAN-C18-beschichteten Fasern für DPT, keine signifikanten Unterschiede in den kalkulierten PPB für DPT auftraten.

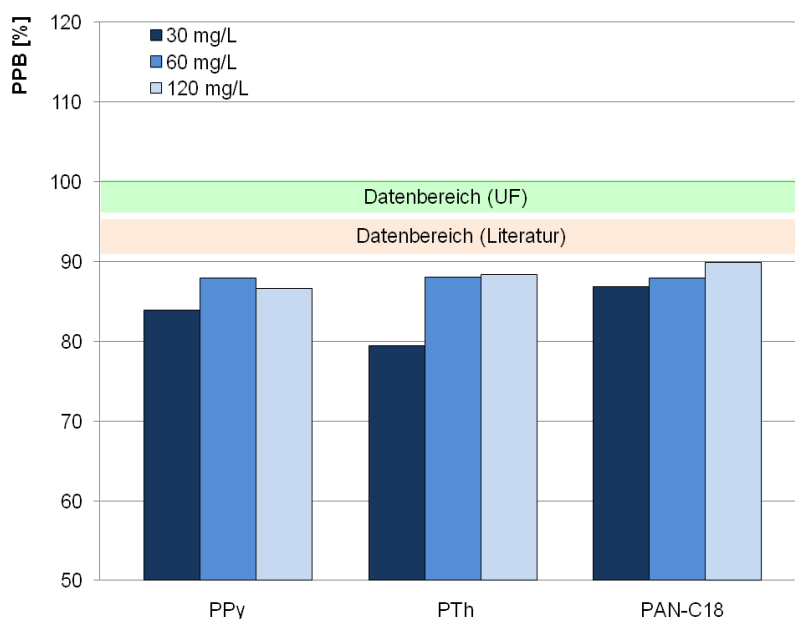


Abb. 29: Vergleich der erzielten PPB für $0,5 \times C_{\max}$, C_{\max} und $2 \times C_{\max}$ an DPT aus heparinisiertem Plasma, die durch die SPME mit drei differenten Fasern (PPy, PTh, PAN-C18) und mit UF erzielt wurden, mit Literaturdaten¹²¹.

Interessanter Weise konnte für die Bestimmung der PPB von DPT festgestellt werden, dass sich Variationen in den Proteingehalten der Adsorptionslösungen auf die SPME stärker als auf die UF auswirkten. So führte eine schrittweise Erhöhung des Proteingehaltes um jeweils +5 % von zunächst 10 % auf final 20 % Proteingehalt der Lösungen zur Abnahme der Extraktionsausbeute um jeweils -19 % für die SPME und -3 % für die UF. Dabei stiegen die kalkulierten PPB durch die SPME – Methode (+ 6–10 %) deutlich nach Erhöhung des Proteinanteils in den Adsorptionslösungen, während die durch die UF bestimmten PPB nur um 4 % anstiegen (Tab. 9 und 12). Dieses Ergebnis kann unter anderem durch die Nachteile der UF gegenüber hoch proteingebundenen und lipophilen Verbindungen hervorgerufen werden^{236, 237}, zwei

Eigenschaften, die auf das Lipopeptid DPT zutreffen. Für hoch proteingebundene Substanzen sind häufig mittels UF kaum freie Arzneistoffkonzentrationen bestimmbar, wodurch überhöhte PPB berechnet werden^{236, 237}. Ein Unterschied in den Einzelwerten der PPB von DPT zwischen SPME und UF zeigte, dass bei gleicher Konzentration und gleichem Proteingehalt die UF deutlich höhere PPB – Werte lieferte (Abb. 22 und 24).

Es muss an dieser Stelle aber auch darauf hingewiesen werden, dass die Bestimmung der PPB mittels SPME für LVX, nach Literaturangaben¹³¹⁻¹³³ ein Fluorchinolon mit einer PPB von 24 – 38 %, in Abhängigkeit vom eingesetzten Beschichtungsmaterial der SPME – Fasern zu deutlich erhöhten Werten führte (Abb. 30). Auch die mittels UF erzielten PPB für LVX lagen mit 44 – 50 % oberhalb des in der Literatur beschriebenen Wertebereiches. Ursächlich dafür könnte der pH – Wert der Lösung sein, da das humane Serumalbumin einer Konformationsänderung in Abhängigkeit des pH – Wertes unterliegt und somit gegebenenfalls Änderungen in der Bindungsfähigkeit zum LVX ($pK_s = 6,05$), das aufgrund seiner sauren Carboxylgruppe und dem basischen Stickstoff am Piperazinring einen zwitterionischen Charakter beim physiologischen pH – Wert von $\sim 7,4$ aufweist, resultieren^{219, 228}. Montesdeoca Esponda et al.²¹⁹ konnten zeigen, dass die Extraktionsfähigkeit von LVX mit SPME – Fasern beim pH – Wert von ~ 7 am effizientesten war. Die für die Berechnung der mittels SPME bestimmten PPB eingesetzte PBS – Lösung besaß jedoch einen pH – Wert von $\sim 8,2 - 8,4$, während heparinisertes Plasma einen pH – Wert von $\sim 7,4$ aufwies. Infolge des Unterschiedes im pH – Wert zwischen den beiden relevanten Adsorptionslösungen können vielleicht veränderte ionische Formen der LVX – Moleküle resultieren. Wenn Substanzen in ionischer Form vorliegen, kann die Verteilung des Analyten zwischen der entsprechenden Adsorptionslösung und der SPME – Faser unvollständig sein²¹⁹. Abdel-Rehim et al.²³⁸ konnten für verschiedene Lokalanästhetika zeigen, dass mit steigendem pH – Wert die PPB ebenfalls anstieg und führten dieses Ergebnis auf einen Wechsel von der geladenen zur ungeladenen Substanzform zurück. Durch diesen Ladungswechsel lagen die eingesetzten Lokalanästhetika bei höheren pH – Werten in einer ungeladenen Form vor, wodurch sie hydrophobe Wechselwirkungen zu den Proteinen eingingen, die zu einer

Erhöhung der PPB der Arzneistoffe führten. Musteata et al.²³⁹ zeigten ebenfalls, dass bei einem Anstieg des pH – Wertes von 7,4 auf 8,4 für basische Arzneistoffe wie Propranolol ($pK_s = 9,1$) der Ionisierungsgrad deutlich zunahm, während für saure Verbindungen wie Ibuprofen ($pK_s = 4,4$) der Grad der Ionisierung gleich blieb. Der Unterschied im pH – Wert zwischen PBS und heparinisiertem Plasma könnte daher durchaus für die zu hohen PPB von LVX, welche mittels SPME bestimmt wurden, mitverantwortlich sein.

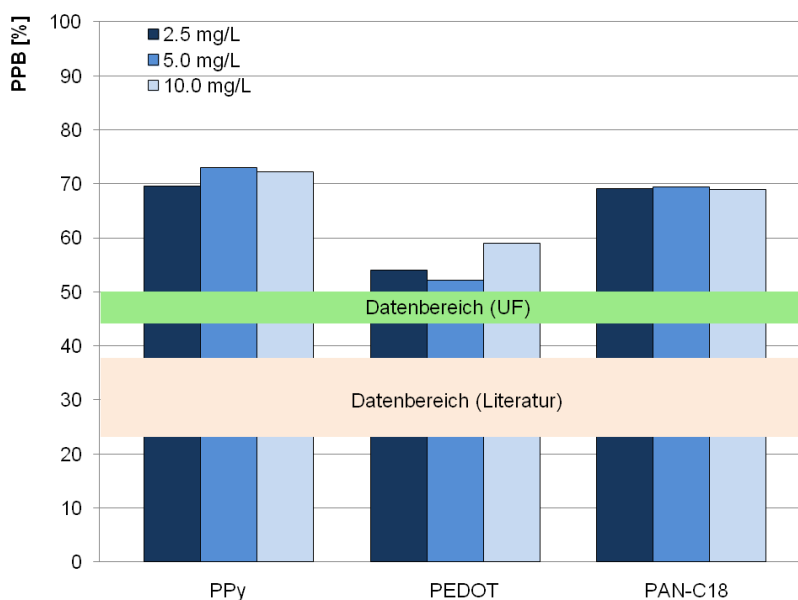


Abb. 30: Vergleich der erzielten PPB für $0,5x C_{max}$, C_{max} und $2x C_{max}$ an LVX aus heparinisiertem Plasma, die durch die SPME mit drei differenten Fasern (PPy, PEDOT, PAN-C18) und mit UF erzielt wurden, mit Literaturdaten¹³¹⁻¹³³.

Während in unseren eigenen Untersuchungen Unterschiede zwischen den mit SPME und UF erzielten PPB für DPT und LVX bestanden, konnten andere Arbeitsgruppen²⁴⁰⁻²⁴³ aufzeigen, dass die SPME anderen Probenvorbereitungstechniken wie der Mikrodialyse gleichwertig beziehungsweise überlegen ist. Als Vorteile der SPME gegenüber der Mikrodialyse beschrieben Cudjoe et al.²⁴⁰ und Zhou et al.²⁴³ dabei die verbesserte Empfindlichkeit, Präzision und Wiederholbarkeit der Messungen sowie der deutlich erweiterte Analytbereich der SPME. So zeigten Cudjoe et al.²⁴⁰, dass für das Monitoring von Neurotransmittern der Einsatz der SPME gegenüber der Mikrodialyse zum Nachweis von doppelt so vielen Neurotransmitter – Verbindungen führte. Der wohl entscheidende Unterschied zwischen der SPME und der Mikrodialyse liegt aber in der Nachweisbarkeit

von Verbindungen mit einem stark hydrophoben Charakter und/oder hohen Proteinbindungen, welche mit der Mikrodialyse aufgrund von Anhaftungen an das erforderliche Probenentnahmezubehör und einer damit einhergehenden (starken) Beeinflussung der Nachweisempfindlichkeit nur schwer oder überhaupt nicht möglich ist^{235, 244}. Tremblay et al.²⁴⁵ haben sowohl die UF als auch die SPME zur Bestimmung von Blut-Gewebe-Verteilungskoeffizienten differenter, schwer flüchtiger Verbindungen wie Herbizide, Insektizide und Fungizide eingesetzt, wobei sie die UF für hydrophile Substanzen ($\log K_{ow} < 0,11$) und die SPME für mehr lipophile Verbindungen ($\log K_{ow} > 1,7$) eingesetzt haben. Diese Einsatzmöglichkeit der SPME und UF verdeutlicht durchaus eine Grundproblematik der beiden Analysentechniken – insbesondere der UF –, für die eine Einschränkung hinsichtlich extrahierbarer Analyten bestehen kann^{236, 237}. So konnte Theodoridis²³⁶ zeigen, dass für das Fluorchinolon Ciprofloxacin mit 45 % PPB vergleichbare Ergebnisse mittels UF, SPME und in der bis dahin publizierten Literatur erzielt wurden, während für das stark proteingebundene Naproxen keine freien Konzentrationen mittels UF ermittelt werden konnten. Vuckovic et al.²³⁷ konnten weiterhin zeigen, dass die SPME gegenüber der UF und der Proteinfällung zu reduzierten Ionsuppressionen in den Messungen und im Vergleich zur UF zu einem erweiterten Anwendungsbereich hinsichtlich hydrophober Verbindungen führte. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die SPME als Probenvorbereitungsverfahren einige Limitationen anderer Methoden umgeht und somit – in Abhängigkeit von der Fragestellung – Vorteile gegenüber diesen Methoden besitzt. Es muss aber immer bedacht werden, dass jede der genannten Extraktionsverfahren seine Vor- und Nachteile besitzt und die erzielten Ergebnisse jeweils stark spezifisch für die eingesetzte Methode und die angewendeten Versuchsbedingungen sind²³⁶.

Die SPME ist eine Extraktionsmethode, die ständigen Weiterentwicklungen unterliegt. Zu diesen Weiterentwicklungen zählt auch der Einsatz neuartiger Beschichtungsmaterialien (zum Beispiel ionische Flüssigkeiten²⁴⁶⁻²⁵⁰, Antikörper²⁵¹, „Molecularly Imprinted Polymers“ (MIP)²⁵¹⁻²⁵³). Dabei sollen die Adsorptionsmaterialien sich durch hohe Selektivitäten für bestimmte Analytgruppen und hohe Affinitäten zu bestimmten chemisch-molekularen

Strukturtypen auszeichnen. Weitere Anforderungen, die an die Beschichtungsmaterialien gestellt werden, sind sowohl eine Stabilität über einen weiten pH – Bereich als auch eine hohe thermische und mechanische Stabilität²⁵³. Neben der Entwicklung neuer Beschichtungsmaterialien zählt die Automatisierung der SPME mit direkter Kopplung an flüssig- oder gaschromatographische Trennverfahren zu den derzeitig stattfindenden Weiterentwicklungen. Durch die SPME – Automatisierungstechnik^{100, 234, 235, 254-258} werden eine Steigerung in der Präzision des Extraktionsschrittes und somit der Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse sowie eine Verringerung der Extraktionszeiten ermöglicht, wodurch wiederum eine größere Anzahl an Analysen in der gleichen Zeit durchgeführt werden kann^{251, 253, 259, 260}. Dieser wichtige Punkt ist insbesondere für einen zukünftigen Einsatz der SPME in routinemäßigen klinischen, forensischen, toxikologischen und umweltanalytischen Laboren von entscheidender Bedeutung^{231, 261, 262}. Einige Studien, deren Methodenentwicklungen das Potential zum klinischen Einsatz besitzen, sind bereits publiziert worden²⁶³. Raikos et al.²⁶⁴ haben eine SPME – Methode zum Nachweis von analgetischen und anästhetischen Arzneistoffen aus menschlichen Urin entwickelt, während Miekisch et al.²⁶⁵ die klinische Anwendbarkeit der SPME zur zeitnahen Überwachung und Bestimmung von Propofolkonzentrationen im Atemgas und Blut von maschinell beatmeten Patienten untersucht haben. Salgado-Petinal et al.²⁶⁶ entwickelten eine Methode zur Bestimmung von selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern aus Urin, wobei sie auch einige der Metabolite mit erfassten.

Weiter in den Fokus des internationalen Interesses wird wohl zukünftig die Frage des Einsatzes der SPME als *in vivo* – Verfahren zur Bestimmung von Arzneistoffkonzentrationen im menschlichen Körper rücken, um ein minimalinvasives und zeitnahes Überwachen der Arzneistoffkonzentrationen zu ermöglichen²⁶⁷. Für einen *in vivo* – Einsatz der SPME insbesondere im menschlichen Körper ist die Biokompatibilität der Beschichtungsmaterialien von bedeutender Relevanz, um nachteilige und/oder toxische Reaktionen im lebenden Organismus zu vermeiden und die Adhäsion von biologischen Molekülen (Proteine, Blutzellen) an der Beschichtungsoberfläche zu minimieren^{114, 230, 235}. Eine Biokompatibilität der SPME – Fasern kann dabei durch die Verwendung von

biokompatiblen Extraktionsmaterialien (Polydimethylsiloxan, PPy) oder durch eine Modifikation herkömmlicher Beschichtungen mit biokompatiblen Polymeren (PAN, Polyethylenglykol) erfolgen^{220, 230, 235, 268-271}. Insbesondere der Einsatz von PAN-C18 beschichteten SPME – Fasern, deren Geometrie hinsichtlich einer *in vivo* – Anwendung optimiert werden müsste, erscheint sehr vielversprechend²³⁰. Ursächlich dafür ist das Vorhandensein stark polarer Nitrilgruppen in der PAN-Beschichtung, welche durch Wasserstoffbrückenbindungen mit Wasser interagieren und zur Bildung einer Hydrathülle beitragen. Durch die Hydratschicht wird die Wechselwirkung von Proteinen und Blutzellen mit dem Beschichtungspolymer unterdrückt^{230, 272}. Die Anwendbarkeit der *in vivo* – SPME für pharmakokinetische und den Stoffwechsel betreffende Studien wurde von verschiedenen Autoren^{226, 273-276} in den letzten Jahren bereits publiziert. Dabei werden für *in vivo* – Analysen Extraktionsbedingungen im nicht erreichten Extraktionsgleichgewichtszustand bevorzugt, um die Extraktionszeit deutlich zu reduzieren (≤ 10 min) und somit eine Reduktion der gesamten Analysenzeit zu bewirken²⁷⁷. Minarghi et al.²³⁰ diskutierten weiterhin, dass die biokompatiblen SPME – Beschichtungsmaterialien zukünftig das Potential besitzen würden, für die Arzneistoffanalysen aus komplexen Matrices wie verschiedenen Gewebearten eingesetzt zu werden. Bojko et al.²⁶⁷ und Cudjoe et al.²⁷⁸ haben bereits erste Applikation für den Einsatz der *in vivo* – SPME zum Nachweis von Medikamenten und Neurotransmittern in Geweben von Ratten, Fischen und Schweinen publiziert, wobei Bojko et al.²⁶⁷ zu der Erkenntnis gelangt sind, dass die *in vivo* – SPME als Alternative zur Entnahme von Gewebesubproben im Tiermodell erfolgreich einsetzbar ist.

So vorteilhaft die *in vivo* – SPME auch gegenüber anderen entsprechenden Methoden wie der Mikrodialyse oder UF aufgrund der deutlich verringerten Analysenzeit und –kosten, der entfallenden Notwendigkeit von Pumpen, der wiederholten Probennahme beim gleichen Tier innerhalb eines kurzen Zeitfensters, der reduzierten Gesamtversuchsschritte und einer damit reduzierten Kontaminations- und Probenverlustmöglichkeit ist²³⁵, bietet die *in vivo* – SPME auch einige Hindernisse auf dem Weg zur Applikation im menschlichen Körper. Neben den oben bereits erwähnten Parametern wie der

mechanischen Stabilität, einer ausreichenden Faserflexibilität und der Biokompatibilität der Beschichtungsmaterialien ist das Design der SPME – Fasern von entscheidender Bedeutung. Die Fasern sollten zur Vermeidung von Schäden an den Venen und Geweben so minimalistisch wie möglich sein, was aber in der Regel zu verringerten extrahierten Analytmengen führt²³⁵, was nur teilweise, insbesondere für Analyten im Spurenbereich, durch eine hoch empfindliche Analysentechnik kompensiert werden kann. Darüber hinaus steht vor der Anwendung der *in vivo* – SPME am Menschen grundsätzlich ein entsprechendes ethisches Votum aus, wobei der Nutzen der *in vivo* – SPME gegenüber einer möglichen Gefährdung des Menschen durch diese neue Methode gründlich abgewogen werden muss. Sicherlich müssen vor diesem finalen Schritt die oben beschriebenen Nachteile der *in vivo* – SPME gelöst werden. Darüber hinaus wird es sicherlich erforderlich sein, validierte, qualitätsgesicherte und –kontrollierte Versuchsabläufe für die einzelnen Anwendungsaufgaben und Einsatzgebiete der SPME zu erarbeiten, bevor die regulierenden Institutionen (zum Beispiel die „US Food and Drug Administration“) die SPME als Standardmethode in routinemäßigen, mit realem Patientenmaterial arbeitenden Laboren medizinischer Einrichtungen zulässt²⁶³. Es bleibt abzuwarten, inwieweit dies möglich ist und ob die *in vivo* – SPME in den nächsten Jahren zum Einsatz am Menschen gelangen wird. Vielversprechende Lösungsansätze einzelner Problempunkte sind bereits vorhanden, wie das Beispiel der PAN-Polymer-Faserbeschichtungen aufzeigt.

6 Zusammenfassung

Zwei flüssigchromatographische Methoden für die quantitative Bestimmung von DPT aus bioanalytisch relevanten Matrices mit photometrischer und massenspektrometrischer Detektion wurden entwickelt und validiert, um unterschiedliche Frage- und Aufgabenstellungen in der DPT-Analytik zu bearbeiten. Die Verwendung einer Luna® C8 – Säule ist insbesondere für ein hohes Probenaufkommen (*High Throughput*) geeignet, während der Einsatz einer Nucleosil® C8 HD – Säule zur Steigerung der Selektivität bei komplexen Matrizen führt.

In Untersuchungen zum pharmakodynamischen Einfluss der drei klinisch relevanten Antibiotika LVX, DPT und CLI auf humane PMN *in vitro* zeigten sich sowohl stimulierende als auch beeinträchtigende Auswirkungen auf die spezifischen Zellfunktionen Chemotaxis, Phagozytose, „Oxidative Burst“ und die Freisetzung von wichtigen Zytokinen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in PMN die zellassozierte Konzentration von DPT, welches primär an Gram-positive Bakterienmembranen bindet, ausreichend hoch ist, sodass der Einsatz von DPT in der Therapie von Keimen wie MRSA eine wichtige Option darstellt. Die zellassozierte Anbindung von DPT an humane PMN ist ein überraschendes Ergebnis, da bislang über die Interaktionsfähigkeit von DPT mit PMN-Zellen (intrazelluläre Aufnahme: ja oder nein?) nur sehr wenig bekannt war.

Die Anwendbarkeit optimierter SPME-Methoden zur direkten Bestimmung der freien, nicht an Matrixbestandteile (Proteine, Zellen) gebundenen Arzneistoffkonzentrationen konnte insbesondere für DPT aus Plasma und für SRL aus Vollblut demonstriert werden. Dabei lieferte die SPME als Probenvorbereitungsverfahren selektive, sensitive, präzise und reproduzierbare Ergebnisse. Als die Extraktionsausbeute beeinflussende Parameter wurden dabei insbesondere die Ad- und Desorptionszeiten sowie die Agitationsart evaluiert. Deutliche Einflüsse auf die Extraktionsausbeuten der SPME wurden zudem durch unterschiedliche Interaktionen zwischen den einzelnen Beschichtungsmaterialien und den Analyten hervorgerufen. Darüber hinaus kann die SPME, wie am Beispiel von DPT gezeigt werden konnte, ein alternatives indirektes Verfahren für die Bestimmung der Plasmaproteinbindung von Arzneistoffen darstellen.

7 Literaturverzeichnis

1. Labro MT, Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? *Clin Microbiol Rev* **13**:615-650 (2000).
2. Hara T, Takemura H, Kanemitsu K, Yamamoto H and Shimada J, Comparative uptake of grepafloxacin and ciprofloxacin by a human monocytic cell line, THP-1. *J Infect Chemother* **6**:162-167 (2000).
3. Robinson JM, Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* **131**:465-469 (2009).
4. Wittmann S, Arlt M, Rothe G and Frohlich D, Differential effects of clindamycin on neutrophils of healthy donors and septic patients. *Int Immunopharmacol* **4**:929-937 (2004).
5. Lampinen M, Sangfelt P, Taha Y and Carlson M, Accumulation, activation, and survival of neutrophils in ulcerative colitis: regulation by locally produced factors in the colon and impact of steroid treatment. *Int J Colorectal Dis* **23**:939-946 (2008).
6. Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO and Cunha FQ, The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* **30 Suppl 1**:3-9 (2008).
7. Klebanoff SJ, Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* **77**:598-625 (2005).
8. Robinson JM, Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol* **130**:281-297 (2008).
9. Jaconi ME, Rivest RW, Schlegel W, Wollheim CB, Pittet D and Lew PD, Spontaneous and chemoattractant-induced oscillations of cytosolic free calcium in single adherent human neutrophils. *J Biol Chem* **263**:10557-10560 (1988).
10. Azuma Y and Ohura K, Alteration of constitutive apoptosis in neutrophils by quinolones. *Inflammation* **27**:115-122 (2003).
11. Webb PR, Wang KQ, Scheel-Toellner D, Pongracz J, Salmon M and Lord JM, Regulation of neutrophil apoptosis: a role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase. *Apoptosis* **5**:451-458 (2000).
12. Watson RW, Redmond HP, Wang JH, Condrón C and Bouchier-Hayes D, Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *J Immunol* **156**:3986-3992 (1996).
13. Baltch AL, Smith RP, Ritz WJ, Carpenter AN, Bopp LH, Michelsen PB, Carolyn CJ and Hibbs JR, Effect of levofloxacin on the viability of intracellular *Chlamydia pneumoniae* and modulation of proinflammatory cytokine production by human monocytes. *Diagn Microbiol Infect Dis* **50**:205-212 (2004).
14. Brandt E, Woerly G, Younes AB, Loiseau S and Capron M, IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Leukoc Biol* **68**:125-130 (2000).

15. Cassatella MA, The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* **16**:21-26 (1995).
16. Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, D'Andrea A, Ma X and Trinchieri G, Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol* **25**:1-5 (1995).
17. Dalhoff A, Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. *Infection* **33 Suppl 2**:55-70 (2005).
18. Gainet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA and Elbim C, Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Lab Invest* **78**:755-762 (1998).
19. Melani C, Mattia GF, Silvani A, Care A, Rivoltini L, Parmiani G and Colombo MP, Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil peripheral blood granulocytes. *Blood* **81**:2744-2749 (1993).
20. Mutschler E, Geisslinger G., Kroemer H. K., Ruth P., Schäfer-Korting M., Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. **9. Auflage**:3-6 (2008).
21. Reato G, Cuffini AM, Tullio V, Mandras N, Roana J, Banche G, Foa R and Carlone NA, Immunomodulating effect of antimicrobial agents on cytokine production by human polymorphonuclear neutrophils. *Int J Antimicrob Agents* **23**:150-154 (2004).
22. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F and Cassatella MA, The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* **177**:195-203 (2000).
23. Dalhoff A and Shalit I, Immunomodulatory effects of quinolones. *Lancet Infect Dis* **3**:359-371 (2003).
24. Azuma Y, Shinohara M, Murakawa N, Endo M and Ohura K, Possible interaction between new quinolones and immune functions in macrophages. *Gen Pharmacol* **32**:609-614 (1999).
25. Azuma Y, Shinohara M, Wang PL and Ohura K, Quinolones alter defense reactions mediated by macrophages. *Int Immunopharmacol* **1**:179-187 (2001).
26. Ballesta S, Pascual A, Garcia I and Perea EJ, Effect of linezolid on the phagocytic functions of human polymorphonuclear leukocytes. *Chemotherapy* **49**:163-166 (2003).
27. Naess A, Stenhaug Kilhus K, Nystad TW and Sornes S, Linezolid and human polymorphonuclear leukocyte function. *Chemotherapy* **52**:122-124 (2006).
28. Arzneimittelgesetz, letzte Aktualisierung 7. August 2013. http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/amg_1976/gesamt.pdf (23.10.2013).

29. Lee FY, Borzilleri R, Fairchild CR, Kamath A, Smykla R, Kramer R and Vite G, Preclinical discovery of ixabepilone, a highly active antineoplastic agent. *Cancer Chemother Pharmacol* **63**:157-166 (2008).
30. Kang MH, Smith MA, Morton CL, Keshelava N, Houghton PJ and Reynolds CP, National Cancer Institute pediatric preclinical testing program: model description for in vitro cytotoxicity testing. *Pediatr Blood Cancer* **56**:239-249.
31. Barker RH, Jr., Dagher R, Davidson DM and Marquis JK, Review article: tolevamer, a novel toxin-binding polymer: overview of preclinical pharmacology and physicochemical properties. *Aliment Pharmacol Ther* **24**:1525-1534 (2006).
32. Guay DR, Patterson DR, Seipman N and Craft JC, Overview of the tolerability profile of clarithromycin in preclinical and clinical trials. *Drug Saf* **8**:350-364 (1993).
33. Carlier MB, Scorneaux B, Zenebergh A, Desnottes JF and Tulkens PM, Cellular uptake, localization and activity of fluoroquinolones in uninfected and infected macrophages. *J Antimicrob Chemother* **26 Suppl B**:27-39 (1990).
34. Garcia I, Pascual A, Ballesta S and Perea EJ, Uptake and intracellular activity of ofloxacin isomers in human phagocytic and non-phagocytic cells. *Int J Antimicrob Agents* **15**:201-205 (2000).
35. Hotta K, Niwa M, Hirota M, Kanamori Y, Matsuno H, Kozawa O, Otsuka T, Matsui N and Uematsu T, Regulation of fluoroquinolone uptake by human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase. *J Antimicrob Chemother* **49**:953-959 (2002).
36. Loo KC, Cario AC, Zhang F and Walters JD, Regulation of ciprofloxacin uptake in human promyelocytic leukemia cells and polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* **61**:619-623 (1997).
37. Pascual A, Garcia I, Ballesta S and Perea EJ, Uptake and intracellular activity of moxifloxacin in human neutrophils and tissue-cultured epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:12-15 (1999).
38. Pascual A, Garcia I and Perea EJ, Uptake and intracellular activity of an optically active ofloxacin isomer in human neutrophils and tissue culture cells. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:277-280 (1990).
39. Uriarte SM, Molestina RE, Miller RD, Bernabo J, Farinati A, Eiguchi K, Ramirez JA and Summersgill JT, Effects of fluoroquinolones on the migration of human phagocytes through *Chlamydia pneumoniae*-infected and tumor necrosis factor alpha-stimulated endothelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2538-2543 (2004).
40. Van der Auwera P, Petrikos G, Matsumoto T and Husson M, Influence of LY146032 on human polymorphonuclear leucocytes in vitro. *J Antimicrob Chemother* **21**:57-63 (1988).

41. Liu X, He Y, Xiao K, White JR, Fusco DN and Papanicolaou GA, Effect of linezolid on clinical severity and pulmonary cytokines in a murine model of influenza A and *Staphylococcus aureus* coinfection. *PLoS One* **8**:e57483.
42. Lyons MA, Reisfeld B, Yang RS and Lenaerts AJ, A physiologically based pharmacokinetic model of rifampin in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:1763-1771.
43. Guo Y, Ramos RI, Cho JS, Donegan NP, Cheung AL and Miller LS, In vivo bioluminescence imaging to evaluate systemic and topical antibiotics against community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected skin wounds in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:855-863.
44. Mandell GL and Coleman E, Uptake, transport, and delivery of antimicrobial agents by human polymorphonuclear neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1794-1798 (2001).
45. Michot JM, Seral C, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP and Tulkens PM, Influence of efflux transporters on the accumulation and efflux of four quinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, garenoxacin, and moxifloxacin) in J774 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2429-2437 (2005).
46. Nau R, Kinzig M, Dreyhaupt T, Kolenda H, Sorgel F and Prange HW, Kinetics of ofloxacin and its metabolites in cerebrospinal fluid after a single intravenous infusion of 400 milligrams of ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:1849-1853 (1994).
47. Paillard D, Grellet J, Dubois V, Saux MC and Quentin C, Discrepancy between uptake and intracellular activity of moxifloxacin in a *Staphylococcus aureus*-human THP-1 monocytic cell model. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:288-293 (2002).
48. Schuler P, Zemper K, Borner K, Koeppe P, Schaberg T and Lode H, Penetration of sparfloxacin and ciprofloxacin into alveolar macrophages, epithelial lining fluid, and polymorphonuclear leucocytes. *Eur Respir J* **10**:1130-1136 (1997).
49. Taira K, Koga H and Kohno S, Accumulation of a newly developed fluoroquinolone, OPC-17116, by human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:1877-1881 (1993).
50. Vazifeh D, Bryskier A and Labro MT, Mechanism underlying levofloxacin uptake by human polymorphonuclear neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:246-252 (1999).
51. Wacke R, Forster S, Adam U, Mundkowski RG, Klar E, Hopt UT and Drewelow B, Penetration of moxifloxacin into the human pancreas following a single intravenous or oral dose. *J Antimicrob Chemother* **58**:994-999 (2006).
52. Chadwick PR and Mellersh AR, The use of a tissue culture model to assess the penetration of antibiotics into epithelial cells. *J Antimicrob Chemother* **19**:211-220 (1987).

-
53. Liu N, Li Y, Su S, Wang N, Wang H and Li J, Inhibition of cell migration by ouabain in the A549 human lung cancer cell line. *Oncol Lett* **6**:475-479.
 54. van Steeg TJ, The 'free drug hypothesis': fact or fiction? Dissertation des "Department Pharmacology, Leiden / Amsterdam Center for Drug Research, (LACDR), Faculty of Science, Leiden University" (2008).
 55. Barbour AM, Schmidt S, Zhuang L, Rand K and Derendorf H, Application of pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling and simulation for the prediction of target attainment of ceftobiprole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using minimum inhibitory concentration and time-kill curve based approaches. *Int J Antimicrob Agents* **43**:60-67.
 56. Barker CI, Germovsek E, Hoare RL, Lestner JM, Lewis J and Standing JF, Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling approaches in paediatric infectious diseases and immunology. *Adv Drug Deliv Rev*.
 57. Duszynska W, Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of antibiotic therapy in severe sepsis. *Anaesthesiol Intensive Ther* **44**:158-164.
 58. Mahalati K and Kahan BD, Clinical pharmacokinetics of sirolimus. *Clin Pharmacokinet* **40**:573-585 (2001).
 59. Wang S and Miller A, A rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of whole blood sirolimus using turbulent flow technology for online extraction. *Clin Chem Lab Med* **46**:1631-1634 (2008).
 60. Israili ZH, Correlation of pharmacological effects with plasma levels of antihypertensive drugs in man. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **19**:25-52 (1979).
 61. Benet LZ and Hoener BA, Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* **71**:115-121 (2002).
 62. Bergan T, Engeset A and Olszewski W, Does serum protein binding inhibit tissue penetration of antibiotics? *Rev Infect Dis* **9**:713-718 (1987).
 63. Burian A, Wagner C, Stanek J, Manafi M, Bohmdorfer M, Jager W and Zeitlinger M, Plasma protein binding may reduce antimicrobial activity by preventing intracellular uptake of antibiotics, for example clindamycin. *J Antimicrob Chemother* **66**:134-137.
 64. Craig WA and Ebert SC, Protein binding and its significance in antibacterial therapy. *Infect Dis Clin North Am* **3**:407-414 (1989).
 65. Craig WA and Kunin CM, Significance of serum protein and tissue binding of antimicrobial agents. *Annu Rev Med* **27**:287-300 (1976).
 66. Craig WA and Suh B, Theory and practical impact of binding of antimicrobials to serum proteins and tissue. *Scand J Infect Dis Suppl*:92-99 (1978).

-
67. Lee BL, Sachdeva M and Chambers HF, Effect of protein binding of daptomycin on MIC and antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:2505-2508 (1991).
 68. Merrikin DJ, Briant J and Rolinson GN, Effect of protein binding on antibiotic activity in vivo. *J Antimicrob Chemother* **11**:233-238 (1983).
 69. Schmidt S, Gonzalez D and Derendorf H, Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci* **99**:1107-1122.
 70. Schmidt S, Rock K, Sahre M, Burkhardt O, Brunner M, Lobmeyer MT and Derendorf H, Effect of protein binding on the pharmacological activity of highly bound antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:3994-4000 (2008).
 71. Zeitlinger M, Sauermann R, Fille M, Hausdorfer J, Leitner I and Muller M, Plasma protein binding of fluoroquinolones affects antimicrobial activity. *J Antimicrob Chemother* **61**:561-567 (2008).
 72. Zeitlinger MA, Sauermann R, Traunmuller F, Georgopoulos A, Muller M and Joukhadar C, Impact of plasma protein binding on antimicrobial activity using time-killing curves. *J Antimicrob Chemother* **54**:876-880 (2004).
 73. Kragh-Hansen U, Chuang VT and Otagiri M, Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull* **25**:695-704 (2002).
 74. Wilkinson GR, Plasma and tissue binding considerations in drug disposition. *Drug Metab Rev* **14**:427-465 (1983).
 75. Bertucci C and Domenici E, Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance. *Curr Med Chem* **9**:1463-1481 (2002).
 76. Israili ZH and Dayton PG, Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab Rev* **33**:161-235 (2001).
 77. Kremer JM, Wilting J and Janssen LH, Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Rev* **40**:1-47 (1988).
 78. Wright JD, Boudinot FD and Ujhelyi MR, Measurement and analysis of unbound drug concentrations. *Clin Pharmacokinet* **30**:445-462 (1996).
 79. Doweiko JP and Nompleggi DJ, Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **15**:207-211 (1991).
 80. Piafsky KM, Disease-induced changes in the plasma binding of basic drugs. *Clin Pharmacokinet* **5**:246-262 (1980).
 81. Notarianni LJ, Plasma protein binding of drugs in pregnancy and in neonates. *Clin Pharmacokinet* **18**:20-36 (1990).

82. Day YS and Myszka DG, Characterizing a drug's primary binding site on albumin. *J Pharm Sci* **92**:333-343 (2003).
83. Murai-Kushiya M, Okada S, Kimura T and Hasegawa R, Stereoselective binding of beta-blockers to purified rat alpha 1-acid glycoprotein. *J Pharm Pharmacol* **45**:225-228 (1993).
84. Kopecky V, Jr., Ettrich R, Hofbauerova K and Baumruk V, Structure of human alpha1-acid glycoprotein and its high-affinity binding site. *Biochem Biophys Res Commun* **300**:41-46 (2003).
85. Fournier T, Medjoubi NN and Porquet D, Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* **1482**:157-171 (2000).
86. Craig WA and Suh B, Changes in protein binding during disease. *Scand J Infect Dis Suppl*:239-244 (1978).
87. Lindup WE and Orme MC, Clinical pharmacology: plasma protein binding of drugs. *Br Med J (Clin Res Ed)* **282**:212-214 (1981).
88. Roberts JA, Pea F and Lipman J, The clinical relevance of plasma protein binding changes. *Clin Pharmacokinet* **52**:1-8.
89. Ulldemolins M, Roberts JA, Rello J, Paterson DL and Lipman J, The effects of hypoalbuminaemia on optimizing antibacterial dosing in critically ill patients. *Clin Pharmacokinet* **50**:99-110.
90. Wong G, Briscoe S, Adnan S, McWhinney B, Ungerer J, Lipman J and Roberts JA, Protein binding of beta-lactam antibiotics in critically ill patients: can we successfully predict unbound concentrations? *Antimicrob Agents Chemother* **57**:6165-6170.
91. Craig WA, Suh, B., Protein Binding and the Antimicrobial Effects: Methods for the Determination of Protein Binding. in V Lorian: *Antibiotics in Laboratory medicine* **Chapter 13**:477-514 (1991).
92. Liu B, Wang J, Wang X, Liu BM, Kong YM, Wang D and Xu SK, Spectrometric Studies on the Sonodynamic Damage of Protein in the Presence of Levofloxacin. *J Fluoresc*.
93. Pacifici GM and Viani A, Methods of determining plasma and tissue binding of drugs. Pharmacokinetic consequences. *Clin Pharmacokinet* **23**:449-468 (1992).
94. Sebillé B, Methods of drug protein binding determinations. *Fundam Clin Pharmacol* **4 Suppl 2**:151s-161s (1990).
95. Whitlam JB and Brown KF, Ultrafiltration in serum protein binding determinations. *J Pharm Sci* **70**:146-150 (1981).
96. Kegler R and Buettner A, Solid-Phase Microextraction (SPME) of antidepressant drugs. *Rechtsmedizin* **23**:353 (2013).

97. Kegler R, Mundkowski RG and Buettner A, Solid-Phase Microextraction (SPME) for toxicological analysis of antidepressants. *Rechtsmedizin* **22**:342 (2012).
98. Szultka M, Kegler R, Fuchs P, Olszowy P, Miekisch W, Schubert JK, Buszewski B and Mundkowski RG, Polypyrrole solid phase microextraction: A new approach to rapid sample preparation for the monitoring of antibiotic drugs. *Anal Chim Acta* **667**:77-82.
99. Kumar A, Gaurav, Malik AK, Tewary DK and Singh B, A review on development of solid phase microextraction fibers by sol-gel methods and their applications. *Anal Chim Acta* **610**:1-14 (2008).
100. Risticvic S, Niri VH, Vuckovic D and Pawliszyn J, Recent developments in solid-phase microextraction. *Anal Bioanal Chem* **393**:781-795 (2009).
101. Vuckovic D, Cudjoe E, Hein D and Pawliszyn J, Automation of solid-phase microextraction in high-throughput format and applications to drug analysis. *Anal Chem* **80**:6870-6880 (2008).
102. Olszowy P, Szultka M, Fuchs P, Kegler R, Mundkowski R, Miekisch W, Schubert J and Buszewski B, New coated SPME fibers for extraction and fast HPLC determination of selected drugs in human blood. *J Pharm Biomed Anal* **53**:1022-1027.
103. Schubert JK, Miekisch W, Fuchs P, Scherzer N, Lord H, Pawliszyn J and Mundkowski RG, Determination of antibiotic drug concentrations in circulating human blood by means of solid phase micro-extraction. *Clin Chim Acta* **386**:57-62 (2007).
104. Theodoridis G, Koster EH and de Jong GJ, Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **745**:49-82 (2000).
105. Ulrich S, Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J Chromatogr A* **902**:167-194 (2000).
106. Kaykhaili M, Dicinoski GW, Smedley R, Pawliszyn J and Haddad PR, Preparation and evaluation of solid-phase microextraction fibres based on functionalized latex nanoparticle coatings for trace analysis of inorganic anions. *J Chromatogr A* **1217**:3452-3456.
107. Xu HL, Li Y, Jiang DQ and Yan XP, Hydrofluoric acid etched stainless steel wire for solid-phase microextraction. *Anal Chem* **81**:4971-4977 (2009).
108. Zhao F, Meng Y and Anderson JL, Polymeric ionic liquids as selective coatings for the extraction of esters using solid-phase microextraction. *J Chromatogr A* **1208**:1-9 (2008).
109. Vas G and Vekey K, Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J Mass Spectrom* **39**:233-254 (2004).
110. Ouyang G, Vuckovic D and Pawliszyn J, Nondestructive sampling of living systems using in vivo solid-phase microextraction. *Chem Rev* **111**:2784-2814.

111. Supelco, Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions. Bulletin **923A**:1-8 (2004).
112. Barroso M, Gallardo E, Margalho C, Avila S, Marques EP, Vieira DN and Lopez-Rivadulla M, Application of solid phase microextraction to the determination of strychnine in blood. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **816**:29-34 (2005).
113. Cardenes L, Ayala JH, Afonso AM and Gonzalez V, Solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the analysis of heterocyclic aromatic amines. J Chromatogr A **1030**:87-93 (2004).
114. Vuckovic D, Shirey R, Chen Y, Sidisky L, Aurand C, Stenerson K and Pawliszyn J, In vitro evaluation of new biocompatible coatings for solid-phase microextraction: implications for drug analysis and in vivo sampling applications. Anal Chim Acta **638**:175-185 (2009).
115. Risticvic S, Lord H, Gorecki T, Arthur CL and Pawliszyn J, Protocol for solid-phase microextraction method development. Nat Protoc **5**:122-139.
116. Tüken T, Polypyrrole films on stainless steel. Surf Coat Technology **200**:4713-4719 (2006).
117. Junting L, Peng C and Suzuki O, Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples. Forensic Sci Int **97**:93-100 (1998).
118. Ligor M and Buszewski B, Determination of menthol and menthone in food and pharmaceutical products by solid-phase microextraction-gas chromatography. J Chromatogr A **847**:161-169 (1999).
119. Wu J and Pawliszyn J, Polypyrrole-coated capillary coupled to HPLC for in-tube solid-phase microextraction and analysis of aromatic compounds in aqueous samples. Anal Chem **73**:55-63 (2001).
120. Zhang X and Bai R, Surface electric properties of polypyrrole in aqueous solutions. Langmuir **19**:10703-10709 (2003).
121. Carpenter CF and Chambers HF, Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens. Clin Infect Dis **38**:994-1000 (2004).
122. LaPlante KL and Rybak MJ, Daptomycin - a novel antibiotic against Gram-positive pathogens. Expert Opin Pharmacother **5**:2321-2331 (2004).
123. Seaton RA, Daptomycin: rationale and role in the management of skin and soft tissue infections. J Antimicrob Chemother **62 Suppl 3**:iii15-23 (2008).
124. Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM and Tally FP, Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. J Antimicrob Chemother **55**:283-288 (2005).

125. Tally FP and DeBruin MF, Development of daptomycin for gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother* **46**:523-526 (2000).
126. Wong FA, Juzwin SJ and Flor SC, Rapid stereospecific high-performance liquid chromatographic determination of levofloxacin in human plasma and urine. *J Pharm Biomed Anal* **15**:765-771 (1997).
127. Cho SH, Im HT, Park WS, Ha YH, Choi YW and Lee KT, Simple method for the assay of clindamycin in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detector. *Biomed Chromatogr* **19**:783-787 (2005).
128. Toutain J, Boselli E, Djabarouti S, Allaouchiche B, Xuereb F, Bernadou JM, Ba B, Saux MC and Breilh D, Determination of linezolid in plasma and bronchoalveolar lavage by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection using a fully automated extraction method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **813**:145-150 (2004).
129. Streit F, Christians U, Schiebel HM, Napoli KL, Ernst L, Linck A, Kahan BD and Sewing KF, Sensitive and specific quantification of sirolimus (rapamycin) and its metabolites in blood of kidney graft recipients by HPLC/electrospray-mass spectrometry. *Clin Chem* **42**:1417-1425 (1996).
130. George J and Morrissey I, The bactericidal activity of levofloxacin compared with ofloxacin, D-ofloxacin, ciprofloxacin, sparfloxacin and cefotaxime against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **39**:719-723 (1997).
131. Hurst M, Lamb HM, Scott LJ and Figgitt DP, Levofloxacin: an updated review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs* **62**:2127-2167 (2002).
132. Wright DH, Brown GH, Peterson ML and Rotschafer JC, Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *J Antimicrob Chemother* **46**:669-683 (2000).
133. Bergogne-Berezin E, Clinical role of protein binding of quinolones. *Clin Pharmacokinet* **41**:741-750 (2002).
134. Dhawan VK and Thadepalli H, Clindamycin: a review of fifteen years of experience. *Rev Infect Dis* **4**:1133-1153 (1982).
135. Spizek J and Rezanka T, Lincomycin, clindamycin and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**:455-464 (2004).
136. Cherlet M, Croubels S and De Backer P, Determination of clindamycin in animal plasma by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **37**:848-853 (2002).
137. Gee T, Ellis R, Marshall G, Andrews J, Ashby J and Wise R, Pharmacokinetics and tissue penetration of linezolid following multiple oral doses. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1843-1846 (2001).
138. MacGowan AP, Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of linezolid in healthy volunteers and patients with Gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother* **51 Suppl 2**:ii17-25 (2003).

139. Swoboda S, Ober M, Anagnostakos K, Geiss HK, Weigand MA and Hoppe-Tichy T, A simple isocratic HPLC assay to determine linezolid concentrations in different biomatrices for in vivo and in vitro studies. *Clin Chem Lab Med* **45**:1019-1022 (2007).
140. Bozdogan B and Appelbaum PC, Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int J Antimicrob Agents* **23**:113-119 (2004).
141. Diekema DJ and Jones RN, Oxazolidinone antibiotics. *Lancet* **358**:1975-1982 (2001).
142. Majcher-Peszynska J, Haase G, Sass M, Mundkowski R, Pietsch A, Klammt S, Schareck W and Drewelow B, Pharmacokinetics and penetration of linezolid into inflamed soft tissue in diabetic foot infections. *Eur J Clin Pharmacol* **64**:1093-1100 (2008).
143. Phillips OA, Abdel-Hamid ME and al-Hassawi NA, Determination of linezolid in human plasma by LC-MS-MS. *Analyst* **126**:609-614 (2001).
144. Lovering AM, Zhang J, Bannister GC, Lankester BJ, Brown JH, Narendra G and MacGowan AP, Penetration of linezolid into bone, fat, muscle and haematoma of patients undergoing routine hip replacement. *J Antimicrob Chemother* **50**:73-77 (2002).
145. Jiao Z, Shi XJ, Li ZD and Zhong MK, Population pharmacokinetics of sirolimus in de novo Chinese adult renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* **68**:47-60 (2009).
146. Salm P, Taylor PJ and Pillans PI, Analytical performance of microparticle enzyme immunoassay and HPLC-tandem mass spectrometry in the determination of sirolimus in whole blood. *Clin Chem* **45**:2278-2280 (1999).
147. Stenton SB, Partovi N and Ensom MH, Sirolimus: the evidence for clinical pharmacokinetic monitoring. *Clin Pharmacokinet* **44**:769-786 (2005).
148. Korecka M and Shaw LM, Review of the newest HPLC methods with mass spectrometry detection for determination of immunosuppressive drugs in clinical practice. *Ann Transplant* **14**:61-72 (2009).
149. MacDonald A, Scarola J, Burke JT and Zimmerman JJ, Clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of sirolimus. *Clin Ther* **22 Suppl B**:B101-121 (2000).
150. Yanez JA, Forrest ML, Ohgami Y, Kwon GS and Davies NM, Pharmacometrics and delivery of novel nanoformulated PEG-b-poly(epsilon-caprolactone) micelles of rapamycin. *Cancer Chemother Pharmacol* **61**:133-144 (2008).
151. Yatscoff R, LeGatt D, Keenan R and Chackowsky P, Blood distribution of rapamycin. *Transplantation* **56**:1202-1206 (1993).
152. Holt DW, Denny K, Lee TD and Johnston A, Therapeutic monitoring of sirolimus: its contribution to optimal prescription. *Transplant Proc* **35**:157S-161S (2003).

153. Bitzinger DI, Schlachetzki F, Lindner R, Trabold B and Dittmar MS, Flow-cytometric measurement of respiratory burst in rat polymorphonuclear granulocytes: Comparison of four cell preparation procedures, and concentration-response evaluation of soluble stimulants. *Cytometry A* **73**:643-650 (2008).
154. Scalia D, Lacetera N, Bernabucci U, Demeyere K, Duchateau L and Burvenich C, In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. *J Dairy Sci* **89**:147-154 (2006).
155. Venaille TJ, Misso NL, Phillips MJ, Robinson BW and Thompson PJ, Effects of different density gradient separation techniques on neutrophil function. *Scand J Clin Lab Invest* **54**:385-391 (1994).
156. Zhao J, Juettner B, Scheinichen D, Jaeger K, Heine J and Piepenbrock S, Respiratory burst activity of polymorphonuclear cells is dependent on the cell preparation technique. *Acta Anaesthesiol Scand* **47**:702-706 (2003).
157. Eggleton P, Gargan R and Fisher D, Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. *J Immunol Methods* **121**:105-113 (1989).
158. Hand WL, Hand DL and King-Thompson NL, Antibiotic inhibition of the respiratory burst response in human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:863-870 (1990).
159. Mtairag EM, Abdelghaffar H and Labro MT, Investigation of dirithromycin and erythromycylamine uptake by human neutrophils in vitro. *J Antimicrob Chemother* **33**:523-536 (1994).
160. Prokesch RC and Hand WL, Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* **21**:373-380 (1982).
161. Food and Drug Administration (USA): Guidance for industry - analytical procedures and methods validation 2001. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf> **14.08.2010**.
162. Food and Drug Administration (USA): Guidance for industry - Process Validation: General Principles and Practices 2011. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070336.pdf> **05.06.2011**.
163. Food and Drug Administration (USA): Reviewer Guidance – Validation of chromatographic methods (1994) <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf> **26.06.2011**.
164. Klempner MS and Styrt B, Clindamycin uptake by human neutrophils. *J Infect Dis* **144**:472-479 (1981).

165. Koga H, High-performance liquid chromatography measurement of antimicrobial concentrations in polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* **31**:1904-1908 (1987).
166. Paegelow I, Trzeczak S, Bockmann S and Vietinghoff G, Migratory responses of polymorphonuclear leukocytes to kinin peptides. *Pharmacology* **66**:153-161 (2002).
167. Dandekar PK, Tessier PR, Williams P, Nightingale CH and Nicolau DP, Pharmacodynamic profile of daptomycin against *Enterococcus* species and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a murine thigh infection model. *J Antimicrob Chemother* **52**:405-411 (2003).
168. DeRyke CA, Sutherland C, Zhang B, Nicolau DP and Kuti JL, Serum bactericidal activities of high-dose daptomycin with and without coadministration of gentamicin against isolates of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3529-3534 (2006).
169. Dvorchik BH, Brazier D, DeBruin MF and Arbeit RD, Daptomycin pharmacokinetics and safety following administration of escalating doses once daily to healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1318-1323 (2003).
170. Rybak MJ, Bailey EM, Lamp KC and Kaatz GW, Pharmacokinetics and bactericidal rates of daptomycin and vancomycin in intravenous drug abusers being treated for gram-positive endocarditis and bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:1109-1114 (1992).
171. Peng GW, Stryd RP, Murata S, Igarashi M, Chiba K, Aoyama H, Aoyama M, Zenki T and Ozawa N, Determination of linezolid in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* **20**:65-73 (1999).
172. Martens-Lobenhoffer J, Kielstein JT, Oye C and Bode-Boger SM, Validated high performance liquid chromatography-UV detection method for the determination of daptomycin in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **875**:546-550 (2008).
173. Tobin CM, Darville JM, Lovering AM and Macgowan AP, An HPLC assay for daptomycin in serum. *J Antimicrob Chemother* **62**:1462-1463 (2008).
174. Gikas E, Bazoti FN, Fanourgiakis P, Perivolioti E, Roussidis A, Skoutelis A and Tsarbopoulos A, Development and validation of a UPLC-UV method for the determination of daptomycin in rabbit plasma. *Biomed Chromatogr* (2009).
175. Baietto L, D'Avolio A, De Rosa FG, Garazzino S, Michelazzo M, Ventimiglia G, Siccardi M, Simiele M, Sciandra M and Di Perri G, Development and validation of a simultaneous extraction procedure for HPLC-MS quantification of daptomycin, amikacin, gentamicin, and rifampicin in human plasma. *Anal Bioanal Chem* **396**:791-798.
176. Dvorchik B, Arbeit RD, Chung J, Liu S, Knebel W and Kastrissios H, Population pharmacokinetics of daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2799-2807 (2004).

177. Gika HG, Michopoulos F, Divanis D, Metalidis S, Nikolaidis P and Theodoridis GA, Daptomycin determination by liquid chromatography-mass spectrometry in peritoneal fluid, blood plasma, and urine of clinical patients receiving peritoneal dialysis treatment. *Anal Bioanal Chem* **397**:2191-2197.
178. Frank MO, Sullivan GW, Carper HT and Mandell GL, In vitro demonstration of transport and delivery of antibiotics by polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:2584-2588 (1992).
179. Alvarez AI, Perez M, Prieto JG, Molina AJ, Real R and Merino G, Fluoroquinolone efflux mediated by ABC transporters. *J Pharm Sci* **97**:3483-3493 (2008).
180. Hand WL and Hand DL, Characteristics and mechanisms of azithromycin accumulation and efflux in human polymorphonuclear leukocytes. *Int J Antimicrob Agents* **18**:419-425 (2001).
181. Lomovskaya O and Watkins W, Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:225-236 (2001).
182. Maeda T, Takahashi K, Ohtsu N, Oguma T, Ohnishi T, Atsumi R and Tamai I, Identification of influx transporter for the quinolone antibacterial agent levofloxacin. *Mol Pharm* **4**:85-94 (2007).
183. Peterson LR, Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin Infect Dis* **33 Suppl 3**:S180-186 (2001).
184. Tillotson GS, Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *J Med Microbiol* **44**:320-324 (1996).
185. Hoogkamp-Korstanje JA and Roelofs-Willemse J, Comparative in vitro activity of moxifloxacin against Gram-positive clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* **45**:31-39 (2000).
186. Bilder von Infektliga (2013). http://www.infektligade/fileadmin/res/bilder/antiinfektiva/antibiotika/daptomycin_wirkmechanismus.gif **08.03.2013**.
187. Kern WV, Daptomycin: first in a new class of antibiotics for complicated skin and soft-tissue infections. *Int J Clin Pract* **60**:370-378 (2006).
188. Sauermann R, Rothenburger M, Graninger W and Joukhadar C, Daptomycin: a review 4 years after first approval. *Pharmacology* **81**:79-91 (2008).
189. Scott WR, Baek SB, Jung D, Hancock RE and Straus SK, NMR structural studies of the antibiotic lipopeptide daptomycin in DHPC micelles. *Biochim Biophys Acta* **1768**:3116-3126 (2007).
190. Straus SK and Hancock RE, Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim Biophys Acta* **1758**:1215-1223 (2006).

191. Lemaire S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP and Tulkens PM, Modulation of the cellular accumulation and intracellular activity of daptomycin towards phagocytized *Staphylococcus aureus* by the P-glycoprotein (MDR1) efflux transporter in human THP-1 macrophages and madin-darby canine kidney cells. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2748-2757 (2007).
192. Rybak MJ, The efficacy and safety of daptomycin: first in a new class of antibiotics for Gram-positive bacteria. *Clin Microbiol Infect* **12 Suppl 1**:24-32 (2006).
193. Becker EL and Showell HJ, The effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ on the chemotactic responsiveness and spontaneous motility of rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol* **143**:466-476 (1972).
194. Estensen RD, Reusch ME, Epstein ML and Hill HR, Role of Ca²⁺ and Mg²⁺ in some human neutrophil functions as indicated by ionophore A23187. *Infect Immun* **13**:146-151 (1976).
195. Gallin JI and Rosenthal AS, The regulatory role of divalent cations in human granulocyte chemotaxis. Evidence for an association between calcium exchanges and microtubule assembly. *J Cell Biol* **62**:594-609 (1974).
196. Marasco WA, Becker EL and Oliver JM, The ionic basis of chemotaxis. Separate cation requirements for neutrophil orientation and locomotion in a gradient of chemotactic peptide. *Am J Pathol* **98**:749-768 (1980).
197. Wilkinson PC, Leucocyte locomotion and chemotaxis. The influence of divalent cations and cation ionophores. *Exp Cell Res* **93**:420-426 (1975).
198. Mahomed AG and Anderson R, Activation of human neutrophils with chemotactic peptide, opsonized zymosan and the calcium ionophore A23187, but not with a phorbol ester, is accompanied by efflux and store-operated influx of calcium. *Inflammation* **24**:559-569 (2000).
199. Cicchetti G, Allen PG and Glogauer M, Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**:220-228 (2002).
200. Paltrinieri S, Panelli S and Sartorelli P, Characteristics of the response of ovine granulocytes (PMNs) to zymosan-activated serum (ZAS) and to recombinant human interleukin-8 (IL-8). *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **47**:421-430 (2000).
201. Jiang LI, Sternweis PC and Wang JE, Zymosan activates protein kinase A via adenylyl cyclase VII to modulate innate immune responses during inflammation. *Mol Immunol* **54**:14-22.
202. Sato M, Sano H, Iwaki D, Kudo K, Konishi M, Takahashi H, Takahashi T, Imaizumi H, Asai Y and Kuroki Y, Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J Immunol* **171**:417-425 (2003).

203. Ikeda Y, Adachi Y, Ishii T, Miura N, Tamura H and Ohno N, Dissociation of Toll-like receptor 2-mediated innate immune response to Zymosan by organic solvent-treatment without loss of Dectin-1 reactivity. *Biol Pharm Bull* **31**:13-18 (2008).
204. Bellavite P, The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Radic Biol Med* **4**:225-261 (1988).
205. Graham DB, Robertson CM, Bautista J, Mascarenhas F, Diacovo MJ, Montgrain V, Lam SK, Cremasco V, Dunne WM, Faccio R, Coopersmith CM and Swat W, Neutrophil-mediated oxidative burst and host defense are controlled by a Vav-PLCgamma2 signaling axis in mice. *J Clin Invest* **117**:3445-3452 (2007).
206. Hampton MB, Kettle AJ and Winterbourn CC, Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* **92**:3007-3017 (1998).
207. Selvatici R, Falzarano S, Mollica A and Spisani S, Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur J Pharmacol* **534**:1-11 (2006).
208. Cedergren J, Follin P, Forslund T, Lindmark M, Sundqvist T and Skogh T, Inducible nitric oxide synthase (NOS II) is constitutive in human neutrophils. *APMIS* **111**:963-968 (2003).
209. Reynaert ML, Hochart-Behra AC, Behra-Miellet J, Gressier B, Mine L, Dine T, Luyckx M, Dubreuil L and Brunet C, Comparison of the in vitro effects of amoxicillin and ampicillin on the polymorphonuclear neutrophil respiratory burst. *J Antimicrob Chemother* **63**:458-461 (2009).
210. Liu Y, Shaw SK, Ma S, Yang L, Luscinskas FW and Parkos CA, Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. *J Immunol* **172**:7-13 (2004).
211. Heine J, Jaeger K, Osthaus A, Weingaertner N, Munte S, Piepenbrock S and Leuwer M, Anaesthesia with propofol decreases FMLP-induced neutrophil respiratory burst but not phagocytosis compared with isoflurane. *Br J Anaesth* **85**:424-430 (2000).
212. Badwey JA, Curnutte JT, Robinson JM, Berde CB, Karnovsky MJ and Karnovsky ML, Effects of free fatty acids on release of superoxide and on change of shape by human neutrophils. Reversibility by albumin. *J Biol Chem* **259**:7870-7877 (1984).
213. Kobayashi T and Robinson JM, A novel intracellular compartment with unusual secretory properties in human neutrophils. *J Cell Biol* **113**:743-756 (1991).
214. Robinson JM, Badwey JA, Karnovsky ML and Karnovsky MJ, Cell surface dynamics of neutrophils stimulated with phorbol esters or retinoids. *J Cell Biol* **105**:417-426 (1987).
215. Thallinger C, Rothenburger M, Marsik C, Wuenscher S, Popovic M, Endler G, Wagner O and Joukhadar C, Daptomycin does not exert immunomodulatory effects in an experimental endotoxin model of human whole blood. *Pharmacology* **81**:57-62 (2008).

-
216. Van Bambeke F, Michot JM and Tulkens PM, Antibiotic efflux pumps in eukaryotic cells: occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics. *J Antimicrob Chemother* **51**:1067-1077 (2003).
217. Carryn S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP and Tulkens PM, Comparative intracellular (THP-1 macrophage) and extracellular activities of beta-lactams, azithromycin, gentamicin, and fluoroquinolones against *Listeria monocytogenes* at clinically relevant concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2095-2103 (2002).
218. Kegler R and Mundkowski R, Solid phase microextraction (SPME): A new tool for the determination of matrix binding (MB) of drugs? *British Journal of Clinical Pharmacology* **75**:18 (2013).
219. Montesdeoca Esponda S, Torres Padron ME, Sosa Ferrera Z and Santana Rodriguez JJ, Solid-phase microextraction with micellar desorption and HPLC-fluorescence detection for the analysis of fluoroquinolones residues in water samples. *Anal Bioanal Chem* **394**:927-935 (2009).
220. Musteata ML, Musteata FM and Pawliszyn J, Biocompatible solid-phase microextraction coatings based on polyacrylonitrile and solid-phase extraction phases. *Anal Chem* **79**:6903-6911 (2007).
221. Panavaite D, Padarauskas A and Vickackaite V, Silicone glue coated stainless steel wire for solid phase microextraction. *Anal Chim Acta* **571**:45-50 (2006).
222. Zeng J, Chen J, Song X, Wang Y, Ha J, Chen X and Wang X, An electrochemically enhanced solid-phase microextraction approach based on a multi-walled carbon nanotubes/Nafion composite coating. *J Chromatogr A* **1217**:1735-1741.
223. Du W, Zhao F and Zeng B, Novel multiwalled carbon nanotubes-polyaniline composite film coated platinum wire for headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic determination of phenolic compounds. *J Chromatogr A* **1216**:3751-3757 (2009).
224. Supelco, Solid Phase Microextraction: A Practical Guide to Quantitation with Solid Phase Microextraction. *Bulletin* **929**:1-8 (2004).
225. Kegler R, Mundkowski R and Buettner A, Solid-Phase Microextraction (SPME) for toxicological analysis of antidepressants. *Rechtsmedizin* **22**:342 (2012).
226. Lord H, Grant RP, Walles M, Incledon B, Fahie B and Pawliszyn J, Development and evaluation of a solid-phase microextraction probe for in vivo pharmacokinetic studies. *Anal Chem* **75**:5103-5115 (2003).
227. Wu J and Pawliszyn J, Preparation and applications of polypyrrole films in solid-phase microextraction. *J Chromatogr A* **909**:37-52 (2001).

228. Ahmad B, Parveen S and Khan RH, Effect of albumin conformation on the binding of ciprofloxacin to human serum albumin: a novel approach directly assigning binding site. *Biomacromolecules* **7**:1350-1356 (2006).
229. Banitaba MH, Hosseiny Davarani SS and Kazemi Movahed S, Comparison of direct, headspace and headspace cold fiber modes in solid phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons by a new coating based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/graphene oxide composite. *J Chromatogr A* **1325**:23-30.
230. Mirnaghi FS and Pawliszyn J, Reusable solid-phase microextraction coating for direct immersion whole-blood analysis and extracted blood spot sampling coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry and direct analysis in real time-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **84**:8301-8309.
231. Boyaci E, Gorynski K, Rodriguez-Lafuente A, Bojko B and Pawliszyn J, Introduction of solid-phase microextraction as a high-throughput sample preparation tool in laboratory analysis of prohibited substances. *Anal Chim Acta* **809**:69-81.
232. Garcia-Esteban M, Ansorena D, Astiasaran I and Ruiz J, Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *Talanta* **64**:458-466 (2004).
233. Lorenzo JM, Influence of the type of fiber coating and extraction time on foal dry-cured loin volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *Meat Sci* **96**:179-186.
234. Xie W, Mullett WM, Miller-Stein CM and Pawliszyn J, Automation of in-tip solid-phase microextraction in 96-well format for the determination of a model drug compound in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**:415-420 (2009).
235. Vuckovic D, Zhang X, Cudjoe E and Pawliszyn J, Solid-phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions. *J Chromatogr A* **1217**:4041-4060.
236. Theodoridis G, Application of solid-phase microextraction in the investigation of protein binding of pharmaceuticals. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **830**:238-244 (2006).
237. Vuckovic D and Pawliszyn J, Systematic evaluation of solid-phase microextraction coatings for untargeted metabolomic profiling of biological fluids by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* **83**:1944-1954.
238. Abdel-Rehim M, Carlsson G, Bielenstein M, Arvidsson T and Blomberg LG, Evaluation of solid-phase microextraction for the study of protein binding in human plasma samples. *J Chromatogr Sci* **38**:458-464 (2000).
239. Musteata FM, Pawliszyn J, Qian MG, Wu JT and Miwa GT, Determination of drug plasma protein binding by solid phase microextraction. *J Pharm Sci* **95**:1712-1722 (2006).

-
240. Cudjoe E, Bojko B, de Lannoy I, Saldivia V and Pawliszyn J, Solid-phase microextraction: a complementary in vivo sampling method to microdialysis. *Angew Chem Int Ed Engl* **52**:12124-12126.
241. Zhang X, Cai J, Oakes KD, Breton F, Servos MR and Pawliszyn J, Development of the space-resolved solid-phase microextraction technique and its application to biological matrices. *Anal Chem* **81**:7349-7356 (2009).
242. Zhang X, Oakes KD, Hoque ME, Luong D, Metcalfe CD, Pawliszyn J and Servos MR, Pre-equilibrium solid-phase microextraction of free analyte in complex samples: correction for mass transfer variation from protein binding and matrix tortuosity. *Anal Chem* **83**:3365-3370.
243. Zhou SN, Ouyang G and Pawliszyn J, Comparison of microdialysis with solid-phase microextraction for in vitro and in vivo studies. *J Chromatogr A* **1196-1197**:46-56 (2008).
244. Li Q, Ma X, Yuan D and Chen J, Evaluation of the solid-phase microextraction fiber coated with single walled carbon nanotubes for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes in aqueous samples. *J Chromatogr A* **1217**:2191-2196.
245. Tremblay RT, Kim D and Fisher JW, Determination of tissue to blood partition coefficients for nonvolatile herbicides, insecticides, and fungicides using negligible depletion solid-phase microextraction (nd-SPME) and ultrafiltration. *J Toxicol Environ Health A* **75**:288-298.
246. He Y, Pohl J, Engel R, Rothman L and Thomas M, Preparation of ionic liquid based solid-phase microextraction fiber and its application to forensic determination of methamphetamine and amphetamine in human urine. *J Chromatogr A* **1216**:4824-4830 (2009).
247. Sun P and Armstrong DW, Ionic liquids in analytical chemistry. *Anal Chim Acta* **661**:1-16.
248. Trujillo-Rodriguez MJ, Yu H, Cole WT, Ho TD, Pino V, Anderson JL and Afonso AM, Polymeric ionic liquid coatings versus commercial solid-phase microextraction coatings for the determination of volatile compounds in cheeses. *Talanta* **121**:153-162.
249. Ho TD, Canestraro AJ and Anderson JL, Ionic liquids in solid-phase microextraction: a review. *Anal Chim Acta* **695**:18-43.
250. Graham CM, Meng Y, Ho T and Anderson JL, Sorbent coatings for solid-phase microextraction based on mixtures of polymeric ionic liquids. *J Sep Sci* **34**:340-346.
251. Spietelun A, Pilarczyk M, Kloskowski A and Namiesnik J, Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. *Chem Soc Rev* **39**:4524-4537.

-
252. Augusto F, Carasek E, Silva RG, Rivellino SR, Batista AD and Martendal E, New sorbents for extraction and microextraction techniques. *J Chromatogr A* **1217**:2533-2542.
253. Spietelun A, Marcinkowski L, de la Guardia M and Namiesnik J, Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. *J Chromatogr A* **1321**:1-13.
254. Kataoka H, Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application -- a review. *Anal Bioanal Chem* **373**:31-45 (2002).
255. Vatinno R, Vuckovic D, Zamboni CG and Pawliszyn J, Automated high-throughput method using solid-phase microextraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of ochratoxin A in human urine. *J Chromatogr A* **1201**:215-221 (2008).
256. Hutchinson JP, Setkova L and Pawliszyn J, Automation of solid-phase microextraction on a 96-well plate format. *J Chromatogr A* **1149**:127-137 (2007).
257. Pereira J, Silva CL, Perestrelo R, Goncalves J, Alves V and Camara JS, Re-exploring the high-throughput potential of microextraction techniques, SPME and MEPS, as powerful strategies for medical diagnostic purposes. Innovative approaches, recent applications and future trends. *Anal Bioanal Chem* **406**:2101-2122.
258. Xie W, Pawliszyn J, Mullett WM and Matuszewski BK, Comparison of solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction in 96-well format for the determination of a drug compound in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Pharm Biomed Anal* **45**:599-608 (2007).
259. Dietz C, Sanz J and Camara C, Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *J Chromatogr A* **1103**:183-192 (2006).
260. Spietelun A, Kloskowski A, Chrzanowski W and Namiesnik J, Understanding solid-phase microextraction: key factors influencing the extraction process and trends in improving the technique. *Chem Rev* **113**:1667-1685.
261. Togunde OP, Cudjoe E, Oakes KD, Mirnaghi FS, Servos MR and Pawliszyn J, Determination of selected pharmaceutical residues in wastewater using an automated open bed solid phase microextraction system. *J Chromatogr A* **1262**:34-42.
262. Bojko B, Vuckovic D, Mirnaghi F, Cudjoe E, Wasowicz M, Jerath A and Pawliszyn J, Therapeutic monitoring of tranexamic acid concentration: high-throughput analysis with solid-phase microextraction. *Ther Drug Monit* **34**:31-37.
263. Bojko B, Cudjoe E, Wasowicz M and Pawliszyn J, Solid-Phase Microextraction. How far are we from clinical practice? *Trends in Analytical Chemistry* **30**:1505-1512 (2011).

-
264. Raikos N, Theodoridis G, Alexiadou E, Gika H, Argiriadou H, Parlapani H and Tsoukali H, Analysis of anaesthetics and analgesics in human urine by headspace SPME and GC. *J Sep Sci* **32**:1018-1026 (2009).
265. Miekisch W, Fuchs P, Kamysek S, Neumann C and Schubert JK, Assessment of propofol concentrations in human breath and blood by means of HS-SPME-GC-MS. *Clin Chim Acta* **395**:32-37 (2008).
266. Salgado-Petinal C, Lamas JP, Garcia-Jares C, Llompart M and Cela R, Rapid screening of selective serotonin re-uptake inhibitors in urine samples using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **382**:1351-1359 (2005).
267. Bojko B, Gorynski K, Gomez-Rios GA, Knaak JM, Machuca T, Spetzler VN, Cudjoe E, Hsin M, Cypel M, Selzner M, Liu M, Keshavjee S and Pawliszyn J, Solid phase microextraction fills the gap in tissue sampling protocols. *Anal Chim Acta* **803**:75-81.
268. Zhou SN, Oakes KD, Servos MR and Pawliszyn J, Application of solid-phase microextraction for in vivo laboratory and field sampling of pharmaceuticals in fish. *Environ Sci Technol* **42**:6073-6079 (2008).
269. Wang Y, Nacson S and Pawliszyn J, The coupling of solid-phase microextraction/surface enhanced laser desorption/ionization to ion mobility spectrometry for drug analysis. *Anal Chim Acta* **582**:50-54 (2007).
270. De Giglio E, Guascito MR, Sabbatin L and Zambonin G, Electropolymerization of pyrrole on titanium substrates for the future development of new biocompatible surfaces. *Biomaterials* **22**:2609-2616 (2001).
271. Mirnaghi FS, Chen Y, Sidisky LM and Pawliszyn J, Optimization of the coating procedure for a high-throughput 96-blade solid phase microextraction system coupled with LC-MS/MS for analysis of complex samples. *Anal Chem* **83**:6018-6025.
272. Elbert DL and Hubbell JA, Surface Treatments of Polymers for Biocompatibility. *Annu Rev Mater Sci* **26**:365-394 (1996).
273. Musteata FM, Musteata ML and Pawliszyn J, Fast in vivo microextraction: a new tool for clinical analysis. *Clin Chem* **52**:708-715 (2006).
274. Musteata FM, de Lannoy I, Gien B and Pawliszyn J, Blood sampling without blood draws for in vivo pharmacokinetic studies in rats. *J Pharm Biomed Anal* **47**:907-912 (2008).
275. Vuckovic D, de Lannoy I, Gien B, Yang Y, Musteata FM, Shirey R, Sidisky L and Pawliszyn J, In vivo solid-phase microextraction for single rodent pharmacokinetics studies of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in mice. *J Chromatogr A* **1218**:3367-3375.

- 276. Vuckovic D, de Lannoy I, Gien B, Shirey RE, Sidisky LM, Dutta S and Pawliszyn J, In vivo solid-phase microextraction: capturing the elusive portion of metabolome. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**:5344-5348.
- 277. Bojko B, Vuckovic D, Cudjoe E, Hoque ME, Mirnaghi F, Wasowicz M, Jerath A and Pawliszyn J, Determination of tranexamic acid concentration by solid phase microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: first step to in vivo analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **879**:3781-3787.
- 278. Cudjoe E, Bojko B, Togunde P and Pawliszyn J, In vivo solid-phase microextraction for tissue bioanalysis. *Bioanalysis* **4**:2605-2619.

8 Anhang

8.1 Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst sowie keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet zu haben. Die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den 21.06.2014

Ricarda Kegler

8.2 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Professor Dr. Bernd Drewelow und Dr. Ralf G. Mundkowski für die Möglichkeit, die praktischen Studien im Institut für Klinische Pharmakologie anfertigen zu können, bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Mitstreiterin Dr. Sandra Möller für die gemeinsame Gestaltung der Promotionsjahre, für die Lösung kleinerer und größerer Probleme bei der Durchführung der Experimente, für das Durchhaltevermögen bei den zahlreichen Tag- und Nachtschichten und viele interessante Gespräche.

Meinen Wegbegleitern gilt ein besonderes Dankeschön: Liane Krause speziell für alle Hilfestellungen rundum der LC-MS(/MS)-Analytik und das freundlichen Arbeitsklima; Katrin Krösche für die Unterstützung bei der Levofloxacin-Analytik; Jana Spaller für viele interessante Gespräche; den ROMBATs Professor Dr. Jochen Schubert, Dr. Wolfram Miekisch und Dr. Patricia Fuchs für die schöne Zusammenarbeit bezüglich zahlreicher HLM-Studien. Dr. Sabine Kischkel, Tina Liebau, Grit Haase und Dr. Gundula Löwe gilt darüber hinaus mein Dank für die stetige Bereitschaft, den Spendern Blut zu entnehmen.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst danke ich für die Gewährung eines sechsmonatigen Forschungsstipendiums, das mir die finanzielle Sicherheit gab, zur Vertiefung von Forschungsinteressen nach Torun (Polen) zu gehen.

Ich möchte mich bei den vielen Blutspendern bedanken, ohne die weder die PMN- noch die SPME-Studien möglich gewesen wären. Meinem langjährigen Trainingspartner Tony Frenzel danke ich für die flexible Anpassung der Trainingszeiten, wenn die Zellstudien mal wieder keinen geregelten Feierabend erlaubten und das Erdulden von „verschärften“ Trainingsbedingungen, wenn die nervliche Anspannung sehr hoch war.

Vier ganz besonderen Menschen, Britta, Uwe, Karolin und Jan, gilt mein allerherzlichster und persönlichster Dank für alles, was wir in knapp zwanzig Jahren miteinander erlebt haben. Ohne eure Liebe, Zuneigung und euer schier unerschütterliches Vertrauen in mich, wäre ich heute nicht der Mensch, der ich jetzt bin.

8.3 Publikationsliste

8.3.1 Originalarbeiten

- Rentsch D, Einsle R, Nowotnik J, Büttner A, Rücker G, **Kegler R**. Gehäuftes Auftreten der Designerdroge Methylon bei den Teilnehmern eines Musikfestivals im Sommer 2013. *Toxichem Krimtech* 2014, 81 (2): 65-68.
- Möller S, **Kegler R**, Sternberg K, Mundkowski RG. Influence of sirolimus-loaded nanoparticles on physiological functions of native human polymorphonuclear neutrophils. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2012; 8 (8): 1293-300.
- Olszowy P, Szultka M, Fuchs P, **Kegler R**, Mundkowski RG, Miekisch W, Schubert JK, Buszewski B. New coated SPME fibres for extraction and fast HPLC determination of selected drugs in human blood. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 53:1022-1027.
- Szultka M, **Kegler R**, Fuchs P, Olszowy P, Miekisch W, Schubert JK, Buszewski B, Mundkowski RG. Polypyrrole solid phase microextraction: A new approach to rapid sample preparation for the monitoring of antibiotic drugs. *Anal Chim Acta* 2010; 667:77-82.

8.3.2 Abstracts

- **Kegler R**, Lehmann C, Rentsch D, Büttner A. Systematic investigation of cocaine-positive samples with regard to the presence of adulterants in Mecklenburg from 2010 to 2012. *Rechtsmedizin* 2013, 23 (4):352.
- **Kegler R**, Büttner A. Solid phase microextraction (SPME) of antidepressant drugs. *Rechtsmedizin* 2013, 23 (4):353.
- Nowotnik J, Rentsch D, **Kegler R**, Büttner A. Drug, pharmaceutical, and alcohol consumption in Mecklenburg (Northern Germany): Analysis of records from 2002 to 2012. *Blutalkohol* 2013, 50 (3): Suppl. I-19.
- **Kegler R**, Büttner A, Nowotnik J, Rücker G, Rentsch D. Trends of drug consumption at a music festival in 2009-2012. *Toxichem Krimtech* 2013, 80 (2): 136-137.

- **Kegler R**, Drewelow B, Mundkowski RG. Pharmacodynamic effects of daptomycin on essential functions of native human polymorphonuclear neutrophils (PMN). *British Journal of Clinical Pharmacology* 2013, 75 (Suppl. 1):16.
- **Kegler R**, Mundkowski RG. Solid phase microextraction (SPME): A new tool for the determination of matrix binding (MB) of drugs? *British Journal of Clinical Pharmacology* 2013, 75 (Suppl. 1):18.
- **Kegler R**, Rentsch D, Nowotnik J, Büttner A. Post-mortem investigation of an 88 cm long dreadlock for drugs of abuse: an unusual case report from the northeast of Germany. *Rechtsmedizin* 2012, 22 (4):340-341.
- **Kegler R**, Mundkowski RG, Büttner A. Solid phase microextraction (SPME) for toxicological analysis of antidepressants. *Rechtsmedizin* 2012, 22 (4):342.
- Mundkowski RG, **Kegler R**, Drewelow B. Influence of levofloxacin and daptomycin on essential functions of human polymorphonuclear neutrophils. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology* 2009; 104 (6):510.

8.4 Tagungsbeiträge

- Manhart J, Rentsch D, **Kegler R**, Reichardt M, Oldörp M, Büttner A. DMSO-Intoxikation – Lösungsmittel vs. Wundermittel? 23. Frühjahrstagung DGRM – Region Nord 2014, Dresden (*Poster*)
- **Kegler R**, Lehmann C, Rentsch D, Büttner A. Systematic investigation of cocaine-positive samples with regard to the presence of adulterants in Mecklenburg from 2010 to 2012. *Jahrestagung DGRM 2013, Saarbrücken (Poster)*.
- **Kegler R**, Büttner A. Solid phase microextraction (SPME) of antidepressant drugs. *Jahrestagung DGRM 2013, Saarbrücken (Poster)*.
- Nowotnik J, Rentsch D, **Kegler R**, Büttner A. Drug, pharmaceutical, and alcohol consumption in Mecklenburg (Northern Germany): Analysis of records from 2002 to 2012. 23rd World Congress International Traffic Medicine Association 2013, Hamburg (*Poster*).

- **Kegler R**, Büttner A, Nowotnik J, Rücker G, Rentsch D. Konsumtrends von illegalen Substanzen während eines Musikfestivals von 2009 bis 2012. 18. *Mosbacher Symposium 2013, Mosbach (Poster)*.
- **Kegler R**, Drewelow B, Mundkowski RG. Pharmacodynamic effects of daptomycin on essential functions of native human polymorphonuclear neutrophils (PMN). 14. *Jahreskongress VKliPha 2012, Rostock (Poster)*.
- **Kegler R**, Mundkowski RG. Solid phase microextraction (SPME): A new tool for the determination of matrix binding (MB) of drugs? 14. *Jahreskongress VKliPha 2012, Rostock (Poster)*.
- **Kegler R**, Mundkowski RG, Büttner A. Solid phase microextraction (SPME) for toxicological analysis of antidepressants. *Jahrestagung DGRM 2012, Freiburg (Poster)*.
- **Kegler R**, Rentsch D, Nowotnik J, Büttner A. Post-mortem investigation of an 88 cm long dreadlock for drug of abuse: an unusual case report in the northeast of Germany. *Jahrestagung DGRM 2012, Freiburg (Poster)*.
- Kaiser HC, **Kegler R**, Büttner A, Mundkowski RG. Entwicklung einer neuartigen Methode (SPME) zur Quantifizierung der wirksamen Fraktion pharmakologisch und forensisch-toxikologischer Arzneistoffe in biologischen Matrices. *Tagung des Department of Life, Light, and Matter 2012, Rostock (Poster)*.
- Rentsch D, **Kegler R**. Ein unerwarteter Befund nach Exhumierung einer Leiche nach 20 Jahren Liegezeit. 16. *Mosbacher Symposium der GTFCh 2009, Mosbach (Poster)*.
- Mundkowski RG, **Kegler R**, Drewelow B. Influence of levofloxacin and daptomycin on essential functions of human polymorphonuclear neutrophils. *Jahrestagung DGPT 2008, Berlin (Poster)*.

8.5 Vorträge

- **Kegler R.** Drogen und Drogennachweisverfahren in der forensischen Toxikologie. Präventiver Projekttag Drogen, Universität Rostock, 06. März 2014.
- **Kegler R.** Forensische Toxikologie – wie Chemiker bei der „Verbrechensaufklärung“ helfen können. Universität Göttingen, 16. Mai 2013.

8.6 Preise

- Nowotnik J, Rentsch D, **Kegler R**, Büttner A. Drug, pharmaceutical, and alcohol consumption in Mecklenburg (Northern Germany): Analysis of records from 2002 to 2012. *23rd World Congress International Traffic Medicine Association 2013, Hamburg (Posterpreis).*
- **Kegler R**, Mundkowsky RG, Büttner A. Solid phase microextraction (SPME) for toxicological analysis of antidepressants. *91. Jahrestagung DGRM 2012, Freiburg (Posterpreis in der Kategorie „Forensische Toxikologie“).*

